

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINALDO JUSTINO FERREIRA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
CELULARES PARA TRIAGEM DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS –
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

CURITIBA
2014

REGINALDO JUSTINO FERREIRA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
CELULARES PARA TRIAGEM DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS –
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

CURITIBA
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

REGINALDO JUSTINO FERREIRA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES CELULARES PARA TRIAGEM DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Bonald Cavalcanti de Figueiredo

Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças, UFPR
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança
e do Adolescente, Faculdades Pequeno Príncipe

Profa. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

Orientadora – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos
e Biotecnologia, UFPR

Profa. Dra. Irina Kerkis

Laboratório de Genética, Instituto Butantan

Profa. Dra. Maria Fernanda Pioli Torres

Departamento de Anatomia, UFPR

Profa. Dra. Míriam Perlingeiro Beltrame

Laboratório de Imunofenotipagem, Hospital das Clínicas, UFPR

Curitiba, 26 de Maio de 2014.

Às mulheres da minha vida, por todo o carinho, incentivo e motivação! À minha filha
Eloise Ravaneli Ferreira; à minha esposa Fabiane Ravaneli; e à minha mãe,
Terezinha de Jesus Correia.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Colegiado e Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por terem me concedido a oportunidade de encontrar neste Programa, o tema de estudo que eu tanto almejava.

Meu muito obrigado à minha orientadora, Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho. São muitos os motivos de gratidão. Do aceite da orientação ao incentivo e desafios propostos mas, acima de tudo, muito obrigado pela confiança demonstrada em cada etapa do trabalho!

Aos amigos, amigas, mestres, doutores e doutoras capazes de tornar o empenho junto às bancadas dos laboratórios uma experiência prazerosa e repleto de aprendizado: muito obrigado Ana Carolina Irioda, Bassam Felipe Mogharbel, Carolina Maria Costa de Oliveira Souza, Dayani de Souza, Heloisa Komechen, Ivan Luiz dos Santos, Lisiane de Castro Poncio, Júlio Cesar de Francisco, Ricardo Corrêa da Cunha, Roberto Rosati, Thiago Demetrius Woiski e Vilmar da Veiga Junior!

Agradeço também ao Diretor Científico do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Dr. Bonald Cavalcanti Figueiredo, por disponibilizar as instalações deste Instituto para a realização do presente estudo e à toda a equipe responsável pelo funcionamento deste Instituto pela acolhida tão gentil que recebi!

Meu agradecimento também à Dra. Francinete Ramos Campos, pela doação da amostra da linhagem tumoral de Ehrlich; à médica patologista M.Sc. Lismary Aparecida de Forville Mesquita, pela realização da análise histopatológica dos tumores identificados e ao estatístico Gledson Luiz Picharski, pelo auxílio prestado durante a análise dos resultados.

Vários amigos também contribuíram de diferentes formas para a realização deste trabalho. Dois deles em especial não poderiam deixar de ter seus nomes aqui registrados: obrigado aos amigos, incentivadores, professores, doutores Valter Augusto Della Rosa e Luiz Nacamura Junior.

Por fim, meu agradecimento mais sensível às pessoas que, por vezes involuntariamente, se tornaram as mais envolvidas no desenvolvimento deste trabalho: Eloise Ravaneli Ferreira, Fabiane Ravaneli, Teresinha de Jesus Correia e Severino Justino Ferreira... amo vocês!

RESUMO

O conhecimento crescente da biologia das células-tronco (CT) e a iminência da sua efetiva aplicação terapêutica têm destacado a relevância de duas importantes questões: a obtenção do efeito terapêutico desejado e a segurança do transplante celular. Dentre os maiores riscos potenciais, destaca-se o de transformação das CT durante seu cultivo. Há grande diversidade de relatos, muitos dos quais contraditórios, ressaltando a necessidade da padronização da avaliação de CT para terapias. Visando contribuir com o estabelecimento de um algoritmo para a triagem de CT, são apresentados neste trabalho os resultados da avaliação de cultivos de curta e longa duração de CT mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMA). CTMA foram obtidas do tecido adiposo epididimal de dez camundongos adultos (*Mus musculus*, Swiss, amostras A1-A10) e cultivadas até a passagem 15 (P15). Os cultivos foram avaliados nas passagens P3, P9 e P15 por meio das técnicas de Papanicolaou, bandamento G (bG), hibridação fluorescente *in situ* (FISH), diferenciação adipogênica e osteogênica, imunofenotipagem por citometria de fluxo e por meio do transplante para avaliação do potencial tumorigênico *in vivo* em camundongos NOD.CD17-Prkdc(scid)/J. Foram detectadas alterações celulares em todas as amostras, nas três passagens indicadas. Por meio da técnica de Papanicolaou foram identificadas alterações na morfologia nuclear e do número de núcleos por célula, enquanto por bG e FISH foram detectadas aneuploidias. A proporção de células alteradas e o número de cromossomos por célula exibiu aumento entre as passagens P3, P9 e P15. As alterações identificadas por bG e FISH apresentaram diferença significativa entre P3 e P9 e entre P3 e P15 ($p < 0,01$). Duas amostras (A2 e A3) exibiram alterações morfológicas e do perfil proliferativo entre P9 e P15, com redução do tempo de duplicação e aumento do período de crescimento exponencial. O potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica foi evidenciado em todas as amostras com perfil de crescimento típico e também na amostra A2. Por meio de imunofenotipagem foi identificada tendência de redução da expressão do marcador CD105 com o aumento das passagens do cultivo, principalmente nas amostras A2 e A3. Estas duas amostras foram as únicas caracterizadas na última passagem como CD105-negativas e que induziram a formação de tumores *in vivo*. Esta transformação exibiu forte correlação com as frequências das alterações identificadas, em especial por meio das técnicas de Papanicolaou em P3 e P9 ($p < 0,001$); bG em P3 ($p < 0,001$); FISH em P3 e P9 ($p < 0,001$); e dependência da perda de expressão do marcador CD105 (χ^2 , $p = 0,949$). Adicionalmente, foi demonstrado que a perda da expressão de CD105 é um importante indicador da transformação de CTMA. Estes resultados evidenciam a viabilidade da aplicação dessas técnicas em um algoritmo para a triagem de células cultivadas, bem como no estabelecimento de uma escala para determinação da segurança da sua aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Células-tronco adultas. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. Técnicas de cultura de células. Transformação celular neoplásica. Triagem.

ABSTRACT

Currently the growing understanding of stem cell biology combined with the expectation of its' therapeutic applications highlighted two important issues: obtaining the desired therapeutic effect and the safety of transplanted cells. Among the greatest risks already report is the potential for neoplastic transformation of the transplanted stem cells (SC). Contradictory research has highlighted the need for systemization of the evaluation of SC cultivations for cellular therapy. To contribute to the establishment of an algorithm for screening SC, this thesis presents evaluation results of short and long term culture of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC). ADMSC were obtained from epididymal adipose tissue of ten adult mice (*Mus musculus*, Swiss, samples A1-A10) and cultured until the 15th passage (P15). These samples were assessed at passages P3, P9 and P15 by Pap test, G-banding (Gb), fluorescent *in situ* hybridization (FISH), adipogenic and osteogenic differentiation, immunophenotyping by flow cytometry and by transplantation to evaluate the tumorigenic potential *in vivo* using NOD.CD17-Prkdc(scid)/J mice. Cellular changes were found by Pap test, Gb and FISH in all samples and passages indicated. Pap test identified changes in nuclear morphology and in the number of nuclei per cell. Gb and FISH identified chromosomal aneuploidies increasing in frequency with increasing passage (P3, P9 and P15). The identified changes by Gb and FISH were statistically significant between P3 and P9 and between P9 and P15 ($p < 0.01$). Two samples (A2 and A3) showed morphological changes and altered proliferative profile between P9 and P15, with a reduction of doubling time and an increased period of exponential growth. The adipogenic and osteogenic differentiation potential was demonstrated in all samples with typical growth profile and also in the sample A2 that demonstrated an atypical growth profile. Immunophenotyping identified a trend of decreasing expression of CD105 marker with increased cultivation time, that was more significant in samples A2 and A3. These two samples were characterized in the last passage as CD105-negative and were the only cultures that resulted in tumor formation *in vivo*. The transformation observed in those samples showed correlation with the frequency of identified changes, mainly through Pap test at P3 and P9 ($p < 0.001$); Gb at P3 ($p < 0.001$); FISH at P3 and P9 ($p < 0.001$); and also dependent of loss of the CD105 expression (χ^2 , $p = 0,949$). Additionally, it was demonstrated that loss of CD105 expression is an important predictor of transformation in SC. These results demonstrate the feasibility of using these techniques for screening cultured cells as well as establishing a system for determining the potential safety risks as related to their therapeutic application.

Key-words: Adult stem cells. Cell- and tissue-based therapy. Cells, cultured. Cell transformation, neoplastic. Straining.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

7-AAD – (corante) 7-aminoactinomicina D

ANOVA – Análise de variância

ASC-H – do inglês, *cannot exclude high grade intraepithelial lesion*

ASC-US – do inglês, *atypical squamous cells of undetermined significance*

BAC – do inglês, *Bacterial artificial chromosome*

CD – do inglês, *Cluster differentiation*

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CTM – Célula-tronco mesenquimal

CTMA – Célula-tronco mesenquimal derivada do tecido adiposo

CTMO – Célula-tronco mesenquimal derivada da medula óssea

DMEM – do inglês, *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMEM/DIFA – do inglês, *Dulbecco's modified Eagle medium*/Diferenciação adipogênica

DMEM/DIFO – do inglês, *Dulbecco's modified Eagle medium*/Diferenciação osteogênica

DMSO – Dimetil sulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH – do inglês, *Fluorescent in situ hybridization*

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico

HSIL – do inglês, *atypical squamous cells*

ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*

LSIL – do inglês, *low grade squamos intraepithelial lesion*

pb – pares de bases

PBS – do inglês, *Phosphate buffer saline*, tampão fosfato salino

PBS/A – do inglês, *Phosphate buffer saline*/Albumina

PBS/PE – do inglês, *Phosphate buffer saline*/Penicilina e Estreptomicina

PE – Penicilina e Estreptomicina

SFB – Soro Fetal Bovino

TAE – tampão tris-acetato EDTA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	VISÃO GERAL DO DELINEAMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL.	50
FIGURA 2 –	EXEMPLAR MACHO DE <i>Mus musculus</i> LINHAGEM SWISS. (A) ANIMAL EM DECÚBITO DORSAL, PREPARADO PARA LAPAROTOMIA. (B) DETALHE DA CAVIDADE ABDOMINAL COM DESTAQUE AO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL (SETA).	69
FIGURA 3 –	CULTIVOS DE CTMA. (A) AMOSTRA A1 EM P15 EXIBINDO CÉLULAS ADERENTES COM ASPECTO FIBROBLASTÓIDE, SIMILAR ÀS AMOSTRAS A4 A A10 NA MESMA PASSAGEM. (B) AMOSTRA A2 EM P13 EXIBINDO PROPORÇÃO EQUIVALENTE DE CÉLULAS ADERENTES E EM SUSPENSÃO. (C) AMOSTRA A3 EM P10 APRESENTANDO PREDOMÍNIO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.	72
FIGURA 4 –	ALGORITMO DE AVALIAÇÃO DE CTM.	74
FIGURA 5 –	CÉLULAS DE QUATRO AMOSTRAS, EXIBINDO BINUCLEAÇÃO (SETAS). (A) A4 EM P3; (B) A3 EM P3; (C) A6 EM P15; E (D) A1 EM P15.	75
FIGURA 6 –	CÉLULAS EM P15, EXIBINDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE NÚCLEOS (SETAS). (A, B) AMOSTRA A8; (C) A9; (D) A4; (E) A5; E (F) A1..	76
FIGURA 7 –	CARIÓTIPO NORMAL, 40,XY DE <i>Mus musculus</i>	81
FIGURA 8 –	METÁFASES APRESENTANDO POLIPLOIDIA E AMPLIFICAÇÕES EXTRACROMOSSÔMICAS. (A) AMOSTRA A9 EM P15, COM 78 CROMOSSOMOS MAIS AMPLIFICAÇÕES. (B) DETALHE DAS AMPLIFICAÇÕES EXTRACROMOSSÔMICAS (SETAS). (C) AMOSTRA A5 EM P15, COM 64 CROMOSSOMOS MAIS AMPLIFICAÇÕES (SETAS).	83
FIGURA 9 –	SÍTIOS DE HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS UTILIZADAS NO ESTUDO, NOS CROMOSSOMOS DE <i>Mus musculus</i>	85
FIGURA 10 –	HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO INTERFÁSICO DA AMOSTRA A4 EM P3, APRESENTANDO NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES AO CONJUNTO NORMAL DOS CROMOSSOMOS X E 5. (A) NÚCLEO CORADO COM DAPI. (B) SINAL FLUORESCENTE DA HIBRIDAÇÃO DA SONDA DERIVADA DO CLONE 243O4 (CROMOSSOMO X, BANDA A1), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 495 GREEN. (C) SINAIS DE HIBRIDAÇÃO DA SONDA DERIVADA DO CLONE 433H2 (CROMOSSOMO 5, BANDA A3), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 550 RED/ORANGE. (D) IMAGEM COMBINADA A PARTIR DAS IMAGENS A, B E C.	86
FIGURA 11 –	HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO INTERFÁSICO DA AMOSTRA A4 EM P3, APRESENTANDO NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES AO CONJUNTO NORMAL DOS CROMOSSOMOS 10 E 16. (A) NÚCLEO CORADO COM DAPI. (B) HIBRIDAÇÃO COM SONDA DERIVADA DO CLONE 313M8 (CROMOSSOMO 10, BANDA D1, SETAS), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 495 GREEN. (C) HIBRIDAÇÃO COM SONDA DERIVADA DO CLONE 77N6 (CROMOSSOMO 16, BANDA A2, SETAS), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 550 RED/ORANGE. (D) IMAGEM COMBINADA A PARTIR DAS IMAGENS A, B E C.	87
FIGURA 12 –	HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO COM NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES À TETRASSOMIA. SETAS CINZAS: CROMOSSOMOS X. SETAS BRANCAS: CROMOSSOMOS 5.	88
FIGURA 13 –	CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A1, A4, A8 E A9, EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL	

	CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA 8. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A9. (E) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A1. (F) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A4.	92
FIGURA 14 –	CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A5, A6 E A7, EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A5. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A6. (E) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (F) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A7.	93
FIGURA 15 –	CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A10 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE. (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).	94
FIGURA 16 –	CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A2 (P13) E A3 (P10) EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), CÉLULAS MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA MESMA DA AMOSTRA A2. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA DA AMOSTRA A3.	94
FIGURA 17 –	CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A2 EM P3 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).	95
FIGURA 18 –	CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A3 EM P3 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).	95
FIGURA 19 –	HIPÓTESE SOBRE A PERDA DE EXPRESSÃO DO MARCADOR CD105 DURANTE O CULTIVO CELULAR. CÍRCULOS AGRUPADOS NA PORÇÃO SUPERIOR REPRESENTAM CÉLULAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE CD105. CÍRCULOS E BARRAS HORIZONTAIS NA METADE INFERIOR DA FIGURA REPRESENTAM POPULAÇÕES CELULARES DAS DIFERENTES AMOSTRAS. LINHAS PONTILHADAS HORIZONTAIS LIGAM SUBPOPULAÇÕES CELULARES COM DIFERENTES PERFIS DE EXPRESSÃO NA MESMA AMOSTRA E PASSAGEM. A INTENSIDADE DE COR DECRESCENTE DA ESQUERDA PARA A DIREITA REPRESENTA A REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DO MARCADOR.	96

FIGURA 20 –	PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i> EXIBIDO PELAS AMOSTRAS A1, A4-A10 EM P15. (A) DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (B) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (C) DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA. (D) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.	97
FIGURA 21 –	PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i> EXIBIDO PELA AMOSTRA A2 EM P13. (A) DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (B) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (C) DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA. (D) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.	98
FIGURA 22 –	INOCULAÇÃO DE CTMA EM ANIMAIS IMUNODEFICIENTES. (A) INJEÇÃO SUBCUTÂNEA. (B) VIABILIDADE CELULAR MÉDIA DE CADA INÓCULO. ...	99
FIGURA 23 –	CAMUNDONGOS FÊMEAS DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 60 DIAS APÓS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA DE CTMA CULTIVADAS. (A) ANIMAIS INOCULADOS COM AS AMOSTRAS A4, A7, A9 E A1, RESPECTIVAMENTE. (B) ANIMAL INOCULADO COM A AMOSTRA A5. (C) ANIMAL INOCULADO COM A AMOSTRA A6. (D) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEL TUMORAÇÃO, NO MESMO LOCAL DA INSERÇÃO DO INÓCULO DA AMOSTRA A10.	100
FIGURA 24 –	CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 50 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DA AMOSTRA A2. EVIDENCIAM-SE: (A) A PRESENÇA DE PROCESSO TUMORAL SÓLIDO SOB A PELE (SETA) E (B) INCHAÇO VENTRAL DEVIDO À INFILTRAÇÃO NA CAVIDADE ABDOMINAL (SETA). (C) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR SUBCUTÂNEO (SETA). (D) LÍQUIDO ABDOMINAL (TUMOR ASCÍTICO) E TUMOR SÓLIDO COLETADOS.	101
FIGURA 25 –	CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 30 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DA AMOSTRA A3. (A) OBSERVAÇÃO DA PRESENÇA DE PROCESSO TUMORAL SÓLIDO SOB A PELE (SETA). (B) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR (SETA). (C) TUMOR SÓLIDO EXTRAÍDO. (D) TRANSFERÊNCIA DE EXPLANTES DO TUMOR PARA GARRAFA DE CULTIVO. (E) CÉLULAS EXTRAVASANDO DO EXPLANTE PARA O MEIO DE CULTIVO (SETA). (F) CÉLULAS EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTIVO.	102
FIGURA 26 –	CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM IMUNODEFICIENTE NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 34 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DO CONTROLE POSITIVO (TUMOR DE EHRLICH). (A) PRESENÇA DE TUMOR SÓLIDO SOB A PELE (SETA). (B) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR (SETAS). (C) TUMORES SÓLIDOS EXTRAÍDOS. (D) CÉLULAS PROVENIENTES DE EXPLANTES DOS TUMORES, EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTIVO.	103
FIGURA 27 –	FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES DERIVADOS DAS AMOSTRAS A2 (A E B) E A3 (C E D), CORADOS COM HEMATOXILINA/EOSINA. DESTACAM-SE: (A) NÚCELOS COM CROMATINA GROSSEIRA (SETAS VERTICAIS) (400x) E MACRONÚCLOES (SETAS HORIZONTAIS) (100x); (B) EXTENSA ÁREA DE NECROSE (SETA) (100x); (C) CÉLULAS EM MITOSE (SETAS); (D) MITOSE ATÍPICA (SETA) (100x).	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	VARIAÇÕES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS ENTRE CTMA E CTMO.	25
TABELA 2 –	PATOLOGIAS COM MODELOS EXPERIMENTAIS EM <i>Mus</i> E/OU <i>Rattus</i> E EXEMPLOS DE ESTUDOS DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CTMA.	44
TABELA 3 –	RELAÇÃO DE ANTICORPOS, MARCAÇÃO E CONTROLES ISOTÍPICOS UTILIZADOS.	64
TABELA 4 –	COMBINAÇÃO (PAINEL) DE ANTICORPOS PARA ANÁLISE DE CADA AMOSTRA.	64
TABELA 5 –	PERFIS DE EXPRESSÃO PARA O MARCADOR CD105 NAS AMOSTRAS DE CTMA CULTIVADAS.	90
TABELA 6 –	RESUMO DAS ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS NOS CULTIVOS DE CTMA.	105
TABELA 7 –	VALORES DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS PAPANICOLAOU, CARIOTIPAGEM E FISH EM P3, P9 E P15 PELO TESTE DE PEARSON, PARA VALORES DE $\alpha=0,05$ E $\alpha=0,01$	106
TABELA 8 –	VALORES DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS PAPANICOLAOU, CARIOTIPAGEM E FISH EM P3, P9 E P15, COM OS RESULTADOS DAS TÉCNICAS DE CITOMETRIA E TUMORIGÊNESE <i>IN VIVO</i> EM P15, PELO TESTE DE WICOLXON (Z), PARA VALORES DE $\alpha=0,05$ E $\alpha=0,01$; E ENTRE CITOMETRIA E TUMORIGÊNESE <i>IN VIVO</i> , EM P15, PELO TESTE QUI-QUADRADO (χ^2).	106

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – IDADE DOS CULTIVOS DE CTMA, EM DIAS, AO TÉRMINO DE CADA PASSAGEM (P1-P14).	70
GRÁFICO 2 – VIABILIDADE DOS INÓCULOS DE CADA PASSAGEM.	71
GRÁFICO 3 – TEMPO DE CULTIVO EM CADA PASSAGEM.	71
GRÁFICO 4 – CRESCIMENTO POPULACIONAL MÉDIO DE TRÊS AMOSTRAS DE CTMA EM P3 (MP3) E P15 (MP15) DURANTE QUINZE DIAS.	73
GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO POPULACIONAL DAS AMOSTRAS A2 E A3, RESPECTIVAMENTE EM P13 E P10; E DE AMOSTRA DO CARCINOMA MAMÁRIO DE EHRlich.	73
GRÁFICO 6 – PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM MORFOLOGIA NUCLEAR ATÍPICA E/OU NÚMERO ALTERADO DE NÚCLEOS, POR AMOSTRA E PASSAGEM.	77
GRÁFICO 7 – PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM MORFOLOGIA NUCLEAR ATÍPICA E/OU NÚMERO ALTERADO DE NÚCLEOS, POR PASSAGEM DO CULTIVO (ANOVA E TESTE DE TUKEY). (A) MÉDIA DAS AMOSTRAS EXCETO A2 E A3. (B) MÉDIA ENTRE TODAS AS AMOSTRAS UTILIZANDO ESTIMATIVAS DOS VALORES CORRESPONDENTES DE A2 E A3 EM P15.	78
GRÁFICO 8 – REGRESSÃO LINEAR DA PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM ALTERAÇÃO, DETECTADA POR MEIO DA TÉCNICA DE PAPANICOLAOU, PARA AS AMOSTRAS A2 E A3.	79
GRÁFICO 9 – PROPORÇÃO DE CARIÓTIPO ANORMAL, POR AMOSTRA E PASSAGEM DO CULTIVO.	80
GRÁFICO 10 – DIFERENÇA ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM CARIÓTIPO NORMAL, POR PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY).	81
GRÁFICO 11 – NÚMERO MÉDIO DE CROMOSSOMOS POR METÁFASE, POR PASSAGEM DO CULTIVO (ANOVA E TESTE DE TUKEY).	82
GRÁFICO 12 – PROPORÇÃO DE METÁFASES COM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, POR PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY).	84
GRÁFICO 13 – PROPORÇÃO DE NÚCLEOS COM NÚMERO DE SINAIS CORRESPONDENTES AO CARIÓTIPO ANORMAL, PARA AS SONDAS UTILIZADAS.	85
GRÁFICO 14 – PROPORÇÃO DE NÚCLEOS COM NÚMERO NORMAL DE SINAIS POR SONDA, POR PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY).	88
GRÁFICO 15 – SOMIAS DETETADAS POR FISH POR PASSAGEM DO CULTIVO.	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 CÉLULAS-TRONCO	18
2.1.1 Células-tronco mesenquimais	19
2.1.1.1 Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea	21
2.1.1.2 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	23
2.1.1.3 Diferenças entre CTMAs e CTMOs	24
2.2 TERAPIA CELULAR	25
2.2.1 CTMs em terapia celular	27
2.2.1.1 CTMOs em terapia celular	27
2.2.1.2 CTMAs em terapia celular	28
2.3 A RELAÇÃO CT vs. CÂNCER	29
2.3.1 A questão do cultivo de CTs	30
2.3.2 Intervenções nos cultivos visando a redução da ocorrência de alterações	34
2.3.3 Consensos sobre o cultivo de CTs	36
2.3.4 Questões teórico-práticas sobre a divisão celular de CTs	37
2.3.5 Células-tronco do câncer?	38
2.4 MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE DOS CULTIVOS DE CTMs	39
2.4.1 Teste de Papanicolaou	39
2.4.2 Citogenética	40
2.4.2.1 Citogenética convencional: cariotipagem	40
2.4.2.2 Citogenética molecular	41
2.4.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	42
2.4.4 Diferenciação celular <i>in vitro</i>	42
2.4.5 Potencial tumorigênico <i>in vivo</i>	43
2.5 MURINOS COMO MODELOS DE ESTUDOS DE CTMs	43
3. JUSTIFICATIVAS	46
4. OBJETIVOS	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	49

5.1.1 Planejamento do estudo	49
5.1.2 Análise estatística	50
5.2 MODELO EXPERIMENTAL	50
5.3 OBTENÇÃO DE CTMAs	51
5.3.1 Anestesia	51
5.3.2 Eutanásia	51
5.3.3 Isolamento de CTMAs	52
5.4 CULTIVO E CINÉTICA DO CRESCIMENTO POPULACIONAL	53
5.4.1 Passagem dos cultivos	53
5.4.2 Criopreservação do excedente celular	54
5.4.3 Cinética do crescimento celular	55
5.5 ANÁLISE DAS CTMAs CULTIVADAS	56
5.5.1 Técnica de coloração de Papanicolaou	56
5.5.2 Citogenética: Cariotipagem por bandamento G	57
5.5.3 FISH	58
5.5.3.1 Isolamento de UFC e cultivo dos clones	59
5.5.3.2 Extração e purificação de DNA	60
5.5.3.3 Fragmentação de DNA	61
5.5.3.4 Marcação dos conjuntos de fragmentos de DNA	61
5.5.3.5 Hibridação fluorescente <i>in situ</i>	62
5.5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	63
5.5.5 Diferenciação celular <i>in vitro</i>	65
5.5.5.1 Diferenciação celular adipogênica	65
5.5.5.2 Diferenciação celular osteogênica	66
5.5.6 Potencial tumorigênico <i>in vivo</i>	67
5.5.6.1 Inoculação	67
5.5.6.2 Avaliação da formação de tumores	67
5.5.6.3 Análise histopatológica dos tumores	68
6. RESULTADOS	69
6.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CTM DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL DE <i>Mus musculus</i> LINHAGEM SWISS	69
6.1.1 Obtenção de tecido adiposo epididimal e rendimento celular	69
6.1.2 Cultivos celulares e passagens	70

6.1.3 Cinética do crescimento populacional	72
6.2 ALGORITMO DE ANÁLISE	74
6.2.1 Papanicolaou	75
6.2.2 Citogenética: Cariotipagem por bandamento G	79
6.2.3 FISH	84
6.2.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	89
6.2.5 Diferenciação adipogênica e osteogênica <i>in vitro</i>	96
6.2.6 Avaliação do potencial tumorigênico <i>in vivo</i>	98
6.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES IDENTIFICADOS	103
6.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS	103
7. DISCUSSÃO	108
7.1 CULTIVO DAS AMOSTRAS DE CTMA _s	108
7.2 ALGORITMO DE ANÁLISE	109
7.2.1 Papanicolaou	109
7.2.2 Citogenética	110
7.2.2.1 Cariotipagem	111
7.2.2.2 FISH	112
7.2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	112
7.2.4 Diferenciação celular <i>in vitro</i>	115
7.2.5 Tumorigênese <i>in vivo</i>	115
7.3 TRANSFORMAÇÃO CELULAR	116
7.3.1 Transformação celular e alterações cromossômicas	116
7.3.2 Transformação celular e variação do perfil de expressão de CD105	118
8. CONCLUSÕES	121
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	123
10. REFERÊNCIAS	125
ANEXOS	149

1 INTRODUÇÃO

O termo célula-tronco pode ser aplicado a um grupo consideravelmente diverso de células. Sem levar em consideração sua origem, apresentam duas propriedades primordiais: a capacidade de auto-renovação prolongada ou ilimitada, sob condições controladas; e o potencial de diferenciação numa variedade de tipos celulares especializados. Estas células têm origem ainda nos primeiros dias do desenvolvimento embrionário dos mamíferos porém, não estão confinadas aos tecidos embrionários, podendo ser encontradas em diversos tecidos adultos. Também estas células-tronco adultas podem dar origem a diferentes linhagens. Na presença dos sinais adequados, estas células podem ter sua diferenciação direcionada para vários tipos celulares especializados.

A crescente caracterização e compreensão sobre propriedades biológicas tem aumentado sensivelmente a expectativa da efetiva utilização terapêutica. Potencialmente, o uso de células-tronco poderia contribuir no tratamento de doenças degenerativas e traumáticas, por meio da reposição celular, gênica ou mesmo na descoberta de novos fármacos.

Neste contexto, as células-tronco obtidas de tecidos adultos têm recebido especial atenção, substituindo amplamente aquelas de origem embrionária. Isto se deve não apenas às questões éticas que envolvem a manipulação de embriões humanos, mas também aos aspectos próprios do potencial terapêutico das células-tronco adultas.

Por razões históricas relacionadas ao tratamento das doenças hematológicas, o principal tecido adulto fonte de células-tronco ainda é a medula óssea. É notório, porém, o acúmulo literário de relatos do isolamento destas células a partir de diversos outros tecidos/órgãos, desde a derme até mesmo o tecido nervoso. Entre as várias fontes potenciais de células-tronco, inúmeros trabalhos têm demonstrado seu isolamento a partir do tecido adiposo.

A relativa abundância e facilidade de obtenção de células-tronco a partir deste tecido aliadas aos resultados promissores obtidos em ensaios pré-clínicos, têm apontado o tecido adiposo como uma fonte ideal de células-tronco.

Contudo, mesmo a partir do tecido adiposo, o montante de células-tronco obtidas não é habitualmente suficiente para a obtenção do efeito terapêutico

desejado, tornando necessária a expansão celular *in vitro* (cultivo celular). Esta expansão ocorre tanto para a obtenção de um número de células adequado quanto para comissionar seu desenvolvimento para uma linhagem celular específica.

Infelizmente, o cultivo celular representa também o acréscimo de um fator de risco importante à utilização terapêutica dessas células, o de transplantar células com potencial maligno. Durante o período *in vitro*, é possível o acúmulo de uma diversidade de variações nas células a serem transplantadas, tanto em nível molecular quanto cromossômico.

Estas modificações são prejudiciais, pois tanto podem comprometer o potencial de diferenciação, reduzindo a eficiência do transplante; como ocasionar a seleção de células com potencial proliferativo aumentado, uma vez que, várias dessas alterações são comuns a linhagens tumorais.

Desta forma, o estudo do monitoramento, bem como da preservação da integridade genômica de células-tronco em cultivo, tornou-se fundamental para garantir níveis elevados de segurança e sucesso nas possíveis aplicações terapêuticas.

Neste contexto, no presente trabalho são descritos os resultados obtidos na avaliação de cultivos de células-tronco derivadas do tecido adiposo por meio de diferentes técnicas de detecção de alterações celulares, visando contribuir com o estabelecimento de um algoritmo para a triagem de células-tronco mesenquimais cultivadas para terapia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

O termo célula-tronco (CT) teve origem ainda no século XIX, em meio à discussão de importantes questões sobre o desenvolvimento embrionário. Define-se atualmente célula-tronco, essencialmente, como uma célula com capacidade de autorrenovação e de diferenciação teoricamente ilimitadas. Estas células têm origem nos primórdios do desenvolvimento embrionário e se mantêm no organismo, possivelmente, por toda a vida adulta (RAMALHO-SANTOS, WILLENBRING, 2007; SALEM, THIEMERMANN, 2010).

Hierarquicamente, as primeiras células formadas a partir da fertilização do ovócito II podem originar tanto as células dos folhetos/tecidos embrionários quanto às do trofoblasto. Esta condição se mantém no embrião humano até o estágio de quatro a oito células, as quais são classificadas como CTs totipotentes (LOVELL, MATHUR, 2004; SALEM, THIEMERMANN, 2010).

Quando da evolução da mórula ao blastocisto, as células que passam a compor sua massa interna têm o potencial de originar os três tecidos embrionários ectoderma, mesoderma e endoderma; mas não mais as células do trofoblasto. Essas CTs são, portanto, “menos indiferenciadas” e por isso, classificadas como pluripotentes. Esta condição se mantém, aproximadamente, até o quinto dia após a fertilização. Em ambos os casos, essas células são denominadas também como CTs embrionárias (CTEs) (LOVELL, MATHUR, 2004; SALEM, THIEMERMANN, 2010).

A formação dos tecidos embrionários ocorre por meio da especialização de CTEs pluripotentes da massa celular interna do blastocisto. Estas passam progressivamente a exibir aspectos morfológicos e/ou funcionais distintos. Contudo, ainda que mais especializadas que as CTEs pluripotentes, as células em cada um dos tecidos embrionários mantêm elevada capacidade de diferenciação. Estas dão origem a todos os tipos celulares derivados do mesmo tecido embrionário, sendo classificadas como CTs multipotentes (SALEM, THIEMERMANN, 2010).

Estas CTs multipotentes se mantêm presentes mesmo nos tecidos/órgãos completamente formados. Nos tecidos de origem mesodérmica, tais CTs ocupam putativamente nichos específicos, sendo mantidas como uma fração das células subendoteliais denominadas pericitos. Tais CTs multipotentes adultas (CTAs) são também denominadas CTs mesenquimais (CTMs) (ODORICO *et al.*, 2001; BRAILE, GODOY, 2005; HORWITZ *et al.*, 2005; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006; MIMEAULT, BATRA, 2006; CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008; THIEMERMANN, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012).

Os eventos biológicos envolvidos na manutenção dessa população celular, tais como a interação com seu microambiente e, sobretudo, os mecanismos de controle sobre sua proliferação e diferenciação, encontram-se ainda incipientemente caracterizados e, portanto, pouco compreendidos. Neste contexto, dois modelos de replicação, não mutuamente excludentes, se destacam: divisão simétrica e assimétrica. Estes modelos exibem diferentes implicações teóricas sobre a reposição e diferenciação celular, além do reparo dos tecidos, e são ainda foco de grande discussão (MORRISON, KIMBLE, 2006; DINGLI *et al.*, 2007; ASHKENAZI *et al.*, 2008). Estes aspectos têm especial relevância quando consideramos o cultivo de CTMs e por isso, serão abordados em tópico específico (seção 2.3.4).

Ainda sob a ótica de hierarquia, há também CTAs caracterizadas como unipotentes. Derivadas das CTs multipotentes, distinguem-se destas por exibirem capacidade de diferenciação restrita a uma dada linhagem celular ou mesmo a um único tipo celular, à exemplo das CTAs da epiderme interfolicular (LOVELL, MATHUR, 2004; LAPOUGE, BLANPAIN, 2008).

2.1.1 Células-tronco mesenquimais

Originadas ainda na mesoderme do embrião, as CTMs persistem nos organismos adultos promovendo a manutenção e reposição dos diferentes tipos celulares que compõem o tecido, em especial quando da ocorrência de lesões (ODORICO *et al.*, 2001; BRAILE, GODOY, 2005; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006; MIMEAULT, BATRA, 2006; CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008; SALEM, THIEMERMANN, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012).

Estas células foram isoladas *ex vivo* primeiramente por Friedenstein *et al.* (1968). A partir da medula óssea de *Rattus*, estes autores descreveram a obtenção de uma fração celular pouco abundante, não fagocítica, não hematopoética, fibroblastóide e com propriedade de adesão ao plástico.

Nos anos seguintes, o mesmo grupo demonstrou também que essa fração celular exibia capacidade clonogênica e de diferenciação *in vitro*, formando estruturas compatíveis com os tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, conjuntivo, além de um tecido de aspecto fibroso (FRIEDENSTEIN *et al.* 1970; 1974). Apenas no início da década de 1990, o termo célula-tronco mesenquimal foi utilizado para designar essa fração celular (CAPLAN *et al.*, 1991).

Nas duas décadas que se seguiram, as CTMs se tornaram significativamente mais frequentes nas publicações sobre CTs, revelando a possibilidade de se isolar este tipo de CTA a partir de um número bastante diversificado de tecidos além da própria medula óssea, tais como placenta, sangue do cordão umbilical, geleia de Wharton, líquido amniótico, âmnio, tuba uterina, sangue venoso periférico, tecido adiposo, fígado, timo, baço, paratireoide, pâncreas, pulmão, polpa dental, periósteo, derme, músculo estriado esquelético (DE BARI *et al.*, 2001; GRONTHOS *et al.*, 2001; MINGUELL *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2003; KRAMPERA *et al.*, 2007; JAZEDJE *et al.*, 2009; SHIH *et al.*, 2009; MOSNA *et al.*, 2010; LIZIER *et al.*, 2012; STRIOGA *et al.*, 2012).

A diversidade de fontes potenciais para o isolamento de CTMs revelou também um importante questionamento: CTMs isoladas de tecidos adultos distintos seriam, de fato, iguais? Os trabalhos inclinados sobre tal questionamento, tanto aqueles investigando CTMs isoladas a partir de diferentes tecidos humanos quanto os com modelos animais, têm revelado a existência de significativa diferença entre essas células. Entre as diferenças relatadas, destacam-se aquelas envolvendo parâmetros imunofenotípicos, capacidade proliferativa e/ou potencial de diferenciação *in vitro* e também a eficiência em aplicações terapêuticas (GRONTHOS *et al.*, 2001; 2002; PANEPUCCI *et al.*, 2004; FESTY *et al.*, 2005; IZADPANAH *et al.*, 2006; 2008; KERN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; NOËL *et al.*, 2008; MOSNA *et al.*, 2010; GAEBEL *et al.*; 2011).

A evidente necessidade de padronização que se estabeleceu, motivou a Sociedade Internacional para a Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) a estabelecer critérios mínimos para a caracterização das CTMs. São eles, (1) a aderência ao plástico em condições convencionais de cultivo; (2) a expressão dos marcadores (*cluster differentiation*, CD) CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 e Stro-1 ($\geq 95\%$, +) combinada à não expressão dos marcadores CD11b ou CD14, CD18, CD19 ou CD79 α , CD31, CD34, CD40, CD45, CD56, CD80, CD86, complexo maior de histocompatibilidade classe II, principalmente HLA-DR ($\leq 2\%$, +); e (3) a diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Contudo, a despeito das muitas fontes de CTMs já descritas, dois tecidos são majoritários nos relatos sobre CTMs: a medula óssea e o tecido adiposo. O volume de trabalhos sobre CTMs derivadas da medula óssea (CTMO) se justifica tanto em razão deste tecido ter sido o primeiro a partir do qual CTMs foram isoladas, quanto devido ao aprimoramento do tratamento das doenças hematológicas (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968; SALEM, THIEMERMANN, 2009; TOLAR *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012).

Quanto ao tecido adiposo, apesar de ter sido descrito como fonte de CTMs há apenas pouco mais de uma década (ZUK *et al.*, 2001; 2002), as CTMs dele derivadas (CTMA) tornaram-se tão frequentes quanto as próprias CTMOs nas publicações atuais. Em várias destas, esse tecido chega a ser apontado como uma fonte ideal para o isolamento de CTMs, pela facilidade de obtenção de maior volume de tecido em comparação aos demais tecidos adultos; pelo fato de o procedimento para sua obtenção ser menos invasivo, podendo ser feito sob anestesia local e, por conseguinte, com menor desconforto ao doador (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; MEYERROSE *et al.*, 2006; NOËL *et al.*, 2008; GRIMES *et al.*, 2009; MIZUNO, 2009; STRIOGA *et al.*, 2012).

2.1.1.1 Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

O complexo microambiente envolvendo vasos sanguíneos, sinusóides e compartimentos hematopoiéticos que compõem a medula óssea vermelha contém uma grandiosa diversidade celular, representada tanto por células em diferentes

estágios de diferenciação que passarão a compor o tecido sanguíneo; quanto por inúmeras células envolvidas na homeostase de todo este processo (SHIPANI, KRONENBERG, 2008).

Este heterogêneo conjunto celular contém duas subpopulações de CTAs: as células-tronco hematopoéticas (CTHs) e as CTMOs. As CTHs dão origem às células do tecido sanguíneo e aos osteoclastos e podem, eventualmente, ser detectadas também no sangue periférico; já as CTMOs seriam tanto fonte dos fatores parácrinos, proteínas indutoras que, ao serem secretadas, estimulam a diferenciação ou proliferação das CTHs, quanto promoveriam a manutenção do microambiente medular. As CTMOs seriam responsáveis, portanto, pela homeostase da medula óssea (GUILBERT, 2000; HUSS *et al.*, 2000; MINGUELL *et al.*, 2001; STRAUER *et al.*, 2002; COTTLER-FOX *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; SHIPANI, KRONENBERG, 2008).

CTMOs representam entre 0,001% e 0,01% das células da medula, sendo esta variação associada à idade, gênero, presença de osteoporose e exposição à radiação ou quimioterapia. Quando do seu isolamento, CTMOs exibem rendimento entre 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de medula óssea coletada (STREM *et al.*, 2005).

CTMOs e CTHs podem ser distinguidas *in vitro* a partir de critérios morfológicos, associados ao cultivo celular; imunofenotípicos e/ou quanto ao potencial de diferenciação celular (REYES *et al.*, 2001; STRAUER *et al.*, 2002; COTTLER-FOX *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004).

Além dos marcadores que integram os critérios estabelecidos pela ISCT para a caracterização de CTMs, vários outros CDs têm sua expressão bem caracterizada em CTMOs, tais como CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD90, CD106, CD117, CD146, CD166 e STRO-1, para os quais as CTMOs são positivas ($\geq 95\%$, +); e CD31 e CD49d, para os quais as CTMOs são negativas ($\leq 2\%$, +) (STREM *et al.*, 2005).

Grande parte destes marcadores indicam uma maior expressão nas CTMOs, de genes cujos produtos são componentes extracelulares, como receptores da matriz e/ou moléculas de adesão (REYES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003). Há no

entanto, relatos também de que a distinção entre CTMOs e CTHs não seria tão evidente (OGAWA *et al.*, 2006; KOIDE *et al.*, 2007).

Independentemente da questão referente à facilidade de distinção entre CTMOs e CTHs porém, a multipotencialidade, a praticidade do isolamento e cultivo, o alto potencial de expansão *in vitro*, somados à baixa imunogenicidade, tornaram as CTMOs ferramentas terapêuticas potenciais em inúmeras condições clínicas (SHIPANI, KRONENBERG, 2008; ACHILLE *et al.*, 2011).

2.1.1.2 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

O tecido adiposo tem ampla distribuição em um organismo adulto e também apresenta, à exemplo da medula óssea, população celular heterogênea. Os adipócitos maduros, células típicas do tecido, correspondem a mais de 90% do volume do tecido mas, ao mesmo tempo, a apenas 20 a 30% das suas células. O restante do tecido é formado por diferentes células, como células vasculares endoteliais, células precursoras endoteliais, pericitos, fibroblastos, macrófagos e também CTMAs (STREM *et al.*, 2005; YOSHIMURA *et al.*, 2006; SUGA *et al.*, 2007; COOK, COWAN, 2008; ETO *et al.*, 2009; LINDROOS *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012).

Quando isolada do tecido, este *pool* marcado pela diversidade celular, é denominada de fração vascular estromal (FVS). Nesta, as CTMAs correspondem a aproximadamente 30 a 40% das células (STREM *et al.*, 2005; YOSHIMURA *et al.*, 2006; SUGA *et al.*, 2007; COOK, COWAN, 2008; ETO *et al.*, 2009; LINDROOS *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012).

O isolamento e caracterização de CTMAs por Zuk *et al.* (2001), a partir do tecido adiposo desagregado por lipoaspiração, demonstrou a viabilidade da obtenção de CTMs por meio de um procedimento menos invasivo que aqueles utilizados para a obtenção de medula óssea ou outros tecidos adultos (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; MEYERROSE *et al.*, 2006; NOËL *et al.*, 2008; GRIMES *et al.*, 2009; MIZUNO, 2009; STRIOGA *et al.*, 2012).

Nos anos seguintes, acumularam-se relatos que não apenas corroboraram a viabilidade demonstrada por Zuk *et al.* (2001), mas também evidenciaram muitas semelhanças entre CTMAs e CTMOs. Dentre estas, destacaram-se a capacidade de

proliferação por períodos indefinidos *in vitro*, a multipotência e o perfil similar de expressão da maioria dos marcadores imunofenotípicos (>90%), indicando a possibilidade de as CTMAs se tornarem ferramentas terapêuticas tão ou mais interessantes que as CTMOs (MOORE *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2005; STREM *et al.*, 2005; BOCHKOV *et al.*, 2007; 2008; ZHANG *et al.*, 2007; GRIMES *et al.*, 2009; MIZUNO, 2009; STRIOGA *et al.*, 2012; ONG *et al.*, 2014).

2.1.1.3 Diferenças entre CTMAs e CTMOs

Diversos estudos comparativos entre CTMAs e CTMOs têm sido publicados, contendo grande diversidade de resultados, não raramente conflitantes. Há relatos de que as CTMAs mantêm, por períodos mais longos de cultivo, menor taxa de senescência, maior taxa de proliferação (IZADPANA *et al.*, 2006; KERN *et al.*, 2006), maior potencial de diferenciação e maior estabilidade citogenética que as CTMOs (IZADPANA *et al.*, 2006).

Também quanto aos potenciais de diferenciação há publicações relatando divergências. De Toni *et al.* (2011) por exemplo, relataram maiores taxas de diferenciação hematopoética *in vitro* e *in vivo* a partir de CTMAs que de CTMOs. CTMAs também têm sido caracterizadas com maior potencial de diferenciação adipogênica (SAKAGUCHI *et al.*, 2005; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011) e menor potencial de diferenciação osteogênica e condrogênica (SAKAGUCHI *et al.*, 2005; BOCHEV *et al.*, 2008; NOËL *et al.*, 2008) que CTMOs. Contudo, há também número significativo de publicações nas quais os potenciais adipogênico (KERN *et al.*, 2006; BOCHEV *et al.*, 2008; NOËL *et al.*, 2008), osteogênico (KERN *et al.*, 2006; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011) e condrogênico (KERN *et al.*, 2006) não exibiram diferença.

Ainda sobre diferenciação, Zhu *et al.* (2009) e Lindroos *et al.* (2011) relataram a ocorrência de influência do gênero e idade do doador sobre o potencial de CTMAs, mas não sobre o de CTMOs. Amostras de doadores masculinos apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica que as de origem feminina (LINDROOS *et al.*, 2011); as quais também apresentaram redução significativa do potencial de diferenciação com o aumento da idade da doadora, não observado entre as células de doadores masculinos (ZHU *et al.*, 2009).

Outro foco de constante investigação quanto à distinção entre CTMAs e CTMOs é o perfil imunofenotípico. Neste contexto também há resultados controversos (STRIOGA *et al.*, 2012), sendo os marcadores CD34, CD49d, CD49f, CD54, CD106 e STRO-1 os mais frequentemente apontados como diferenciais entre essas CTMs, como indicado na Tabela 1.

TABELA 1 – VARIAÇÕES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS ENTRE CTMA E CTMO.

Marcador	CTMA	CTMO	Referência
CD34	+ → <+	-	Mitchel <i>et al.</i> (2006), Mosna <i>et al.</i> (2010), Maumus <i>et al.</i> (2011)
	-	-	Zuk <i>et al.</i> (2002), Yañez <i>et al.</i> (2006)
CD49d	+ ou ++	-	Noël <i>et al.</i> (2008)
CD49f	<+	+ ou ++	Pachón-Peña <i>et al.</i> , 2011
CD54	++	+	Yañez <i>et al.</i> (2006)
CD106	-	+	Noël <i>et al.</i> (2008)
STRO-1	<+ ou +	+	Rada <i>et al.</i> (2011)

Legenda: -, não expresso; <+, fracamente expresso; +, moderadamente expresso; ++, fortemente expresso; + → <+, moderadamente expresso ao isolamento, exibindo redução durante o cultivo.

Com resultados menos controversos, mas ainda dependente de caracterização mais precisa, encontram-se os perfis proteômico e de transcriptoma de CTMAs e CTMOs. Há relatos reportando a ocorrência de níveis de expressão diferencial de aproximadamente 10% dos genes, contudo, apenas 3,4% podendo ser considerados CTMA- ou CTMO-específicos (IZADPANAH *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007; NOËL *et al.*, 2008). Tais divergências se caracterizam, provavelmente, como a base da diferença observada também em propriedades imunomodulatórias dessas células (IVANOVA-TODOROVA *et al.*, 2009).

2.2 TERAPIA CELULAR

Com primórdios ainda na primeira metade do século XX, nos trabalhos experimentais de Alexis Carrel e Paul Niehans, foi apenas nas últimas décadas

desse século que “terapia celular” e “célula-tronco” tornaram-se praticamente sinônimos (LEFRÈRE, BERCHE, 2010; MERCHANT, TAN, 2013).

Idealmente, CTs seriam utilizadas em terapias a partir do controle sobre sua diferenciação *in vitro*. Ao direcioná-la a um tecido específico, seria possível após seu transplante, promover a reposição e/ou reparo de um tecido lesado. Virtualmente seria possível recuperar qualquer tipo de tecido, fosse o muscular, como no tratamento de insuficiência cardíaca e/ou infarto; endócrino, no tratamento do diabetes; ou mesmo neurológico, como no tratamento da doença de Parkinson e/ou de lesões da medula espinhal (BRAILE, GODOY, 2005; MIMEAULT, BATRA, 2006).

Neste contexto, as CTEs foram as primeiras CTs apontadas como alvos potenciais para a terapia celular, em especial, pela possibilidade virtual de se manipular células em estágio toti/pluripotente. Contudo, apesar de ainda se caracterizarem como ferramentas ideais, senão únicas, ao estudo dos estágios iniciais do desenvolvimento humano, em terapia celular, CTEs foram amplamente substituídas por CTAs, principalmente por CTMs (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; BOCHKOV *et al.*, 2007; 2008; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009).

Esta substituição resultou não apenas das muitas questões éticas que envolvem a manipulação de embriões humanos, mas também da caracterização de aspectos das CTMs que indicaram um elevado potencial terapêutico. Entre estes aspectos, destacaram-se: (1) a possibilidade de se obter CTMs, virtualmente, de qualquer tecido do próprio paciente; por conseguinte, (2) a vantagem inerente ao transplante autólogo; (3) a possibilidade de se obter quantitativo celular compatível com o efeito terapêutico almejado, por meio do cultivo celular; e (4) a possibilidade de indução da diferenciação ou mesmo transdiferenciação das CTMs em tipos celulares especializados (OSWALD *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; DEZAWA *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2006; TIMPER *et al.*, 2006; BOCHKOV *et al.*, 2007; KRAMPERA *et al.*, 2007; PĂUNESCU *et al.*, 2007; ANGHILERI *et al.*, 2008; BOCHKOV *et al.*, 2008; KUO, TUAN, 2008; AURICH *et al.*, 2009; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; MIZUNO, 2009; STRIOGA *et al.*, 2012).

2.2.1 CTMs em terapia celular

Além dos aspectos destacados anteriormente, o predomínio de CTMs nos estudos das potenciais aplicações terapêuticas de CTs tem respaldo também na identificação de importantes propriedades clínicas, como a mobilização preferencial destas para os sítios de lesões nos tecidos, sua capacidade imunomodulatória e baixa imunogenicidade (FANG *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; VANIKAR *et al.*, 2010; SOMOZOA, RUBIO, 2012; STRIOGA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Esta combinação de fatores possibilitou que muitos estudos ultrapassassem a fase pré-clínica, chegando às fases clínicas I/II e II/III. Como exemplo, o levantamento feito por Roemeling-van Rhijn *et al.* (2013a) identificou na base de dados “ClinicalTrials.gov” do Instituto Nacional de Saúde do Governo dos Estados Unidos da América, no mês de Abril de 2013, o registro de mais de trezentos estudos nos quais CTMs seriam administradas a pacientes.

Em meio às diferentes possibilidades de fontes de CTMs, as CTMOs e CTMAs são que exibem o potencial terapêutico melhor caracterizado até o momento (WANG *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; VANIKAR *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

2.2.1.1 CTMOs em terapia celular

CTMOs são ainda as CTMs com a mais detalhada caracterização da segurança clínica e do potencial terapêutico em diferentes doenças. Em especial, quanto aos estudos em modelos animais, há um numeroso registro em diferentes organismos-modelo, além de um espectro amplo de índices de morbidade e/ou mortalidade das doenças-alvo (WANG *et al.*, 2006; SHIPANI, KRONENBERG, 2008; TONTI *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012).

Dentre os modelos animais, destacam-se quantitativamente os estudos em murinos (*Mus* e *Rattus*) (ORTIZ *et al.*, 2003; TÖGEL *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2011; MABUCHI *et al.*, 2013), mas estudos em animais de maior porte também são frequentes, contemplando desde coelhos (WANG *et al.*, 2004),

cães (SILVA *et al.*, 2005;), porcos (PRICE *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2008), cabras (MURPHY *et al.*, 2003) e símios (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2006).

Quanto às doenças-alvo, também em modelos animais, os estudos apresentam condições clínicas com diferentes graus de morbidade e/ou mortalidade, permitindo identificar ensaios no tratamento tanto de doenças com baixa morbidade, à exemplo da incontinência urinária (KIM *et al.*, 2011) e disfunção erétil (BIVALACQUA *et al.*, 2007); quanto condições clínicas com elevada morbidade e/ou mortalidade, como queimaduras profundas (FU *et al.*, 2006) e traumatismo crânio-encefálico (MAHMOOD *et al.*, 2003).

O amplo registro de resultados promissores torna as CTMOs as CTs mais frequentes nos estudos em fase clínica. Em consulta à base de dados “ClinicalTrials.gov” do Instituto Nacional de Saúde do Governo dos Estados Unidos da América, em Fevereiro de 2014, foi identificado o registro de mais de 700 estudos com CTMOs, apenas em fase de recrutamento de pacientes. Estes estudos estão distribuídos principalmente entre América do Norte (465), Europa (138) e Ásia Oriental (57) (NIH, 2014a).

2.2.1.2 CTMAs em terapia celular

Assim como para as CTMOs, o efeito terapêutico e a segurança clínica do uso de CTMAs no tratamento de diferentes doenças também é alvo de ampla investigação; também exibindo grande diversidade de organismos-modelos e de correlação entre a doença-alvo e a morbidade e/ou a mortalidade (BOCHKOV *et al.*, 2008; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GIMBLE *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012).

Entre os modelos animais, os estudos também incluem principalmente murinos (*Mus* e *Rattus*) (COWAN *et al.*, 2004; MOON *et al.*, 2006; CHANDRA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011), mas estudos em animais de maior parte também são relatados, como coelhos (ZHANG *et al.*, 2007), cães (BLACK *et al.*, 2008), ovelhas (HALBERSTADT *et al.*, 2002), porcos (VALINA *et al.*, 2007) e equinos (NIXON *et al.*, 2008).

Da mesma forma, o espectro das doenças é tão amplo quanto aquele dos estudos com CTMOs, incluindo condições clínicas com baixa morbidade relativa, como a rinite alérgica (CHO *et al.*, 2009) e lesões tendíneas (UYSAL, MIZUNO,

2011), até condições com alta morbidade e/ou mortalidade, tal como no acidente vascular cerebral hemorrágico (KIM *et al.*, 2007) e lesões de medula (RYU *et al.*, 2009).

Mesmo exibindo um registro histórico menor que o de CTMOs, atualmente os estudos em fase clínica utilizando CTMAs também são numerosos. Em consulta à mesma base de dados “ClinicalTrials.gov”, também em Fevereiro de 2014, foi identificado o registro de 65 estudos de aplicações terapêuticas de CTMAs, também em fase de recrutamento, distribuídos principalmente entre América do Norte (27), Europa (21) e Ásia Oriental (11) (NIH, 2014b).

2.3 A RELAÇÃO CT vs. CÂNCER

Contrapondo-se às muitas publicações sobre as potenciais aplicações terapêuticas de CTs, nos últimos anos têm-se acumulado também relatos descrevendo o risco de estas células exibirem transformação *in vitro*. A transformação seria o resultado de falhas na homeostase dos processos de divisão e/ou manutenção do status indiferenciado e/ou ainda, devido ao acúmulo de alterações genéticas durante o cultivo (BUZZARD *et al.*, 2004; MAITRA *et al.*, 2005; BOCHKOV *et al.*, 2007; FORONI *et al.*, 2007; BOCHKOV *et al.*, 2008; CATALINA *et al.*, 2008; MEZA-ZEPEDA *et al.*, 2008; BERNARDO *et al.*, 2009; BLUM, BENVEISTY 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MOHRIN *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012; MANDEL *et al.*, 2013).

Estes temas têm-se mostrado significativamente mais frequentes na literatura sobre CTs, contudo, não há até o momento, consenso sobre seus fatores causais, sobre a possibilidade de se minimizar esse risco ou mesmo de como atestar a segurança do uso de uma amostra em particular de CTs, independentemente destas serem CTAs/CTMs, CTEs, cultivadas ou não (SHAHDADFAR *et al.*, 2005; IMREH *et al.*, 2006; LANGE *et al.*, 2007; TOLAR *et al.*, 2007; CATALINA *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2008; BOCHKOV *et al.*, 2009; DE LA FUENTE *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; MAAS *et al.*, 2010; STEPHENSON *et al.*, 2010; TARTE *et al.*, 2010; TORSVIK *et al.*, 2010; CRESPO-DIAZ *et al.*, 2011; POLONI *et al.*, 2011; CHEN *et*

al., 2012; DUAİLÍBI *et al.*, 2012; ESTRADA *et al.*, 2012; FUNK *et al.*, 2012; HARRISON, 2012; MARTINS-TAYLOR, XU, 2012; MUNTÍÓN *et al.*, 2012; SENSEBÉ *et al.*, 2012; UEYAMA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

2.3.1 A questão do cultivo de CTs

O cultivo celular é uma condição essencial para a quase totalidade das potenciais aplicações terapêuticas de CTs. Isto decorre do fato de que, mesmo nos tecidos com alto rendimento relativo, à exemplo do tecido adiposo, a quantidade de CTAs que se pode isolar é, habitualmente, insuficiente para a promoção do efeito terapêutico desejado. Adicionalmente, há fatores que podem tornar o rendimento ainda menor, como o tecido selecionado como fonte de CTAs e condições fisiológicas particulares do organismo doador, como a presença de outras patologias ou idade avançada (PUISSANT *et al.*, 2005; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GARCIA-OLMO *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; SPIROPOULOS *et al.*, 2011; VAN DER SPOEL *et al.*, 2011; DUAİLÍBI *et al.*, 2012; BENTIVEGNA *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013a).

O cultivo de células animais se tornou possível ainda nas primeiras décadas do século XX, a partir dos trabalhos pioneiros de Ross Granville Harrison e Alexis Carrel. Seus muitos sucessores desenvolveram e aprimoraram métodos que tornaram a prática de se cultivar células animais, isoladas de diferentes tecidos e/ou organismos, humanos ou não, uma prática comum em pesquisa (DOYLE *et al.*, 1998; ALVES, GUIMARÃES, 2010; MERCHAN, TAN, 2013).

O objetivo, *a priori*, no cultivo de determinado tipo celular é aumentar o seu número, sem que as células formadas exibam divergência da ou das células utilizadas para se iniciar o cultivo. Para tanto, as células a serem cultivadas são dispostas em um meio no qual tenta-se mimetizar as condições fisiológicas do tecido e/ou organismo de origem. Neste contexto, tanto o conhecimento incompleto sobre as condições fisiológicas de origem, quanto a dificuldade em mimetizar condições específicas conhecidas, à exemplo da arquitetura tridimensional do tecido, constituem-se em fatores potencialmente interferentes no cultivo (ALVES, GUIMARÃES, 2010).

Diante da diversidade e complexidade destes fatores, foram desenvolvidos diferentes métodos para o cultivo de CTAs. Particularmente no cultivo de CTMs, os métodos se assemelham quanto à deposição das células em frascos de paredes plásticas contendo uma solução nutriente – o “meio de cultivo” propriamente dito –, mas que pode apresentar diferentes formulações e denominações; e também quanto fato deste meio ser suplementado com soro, frequentemente heterólogo, e/ou com fatores de crescimento específicos (SHAHDADFAR *et al.*, 2005; ESLAMINEJAD *et al.*, 2009).

O cultivo de CTs é etapa obrigatória nos estudos com o objetivo de caracterização de seus potenciais de autorrenovação e/ou de diferenciação *in vitro*. Teoricamente, uma vez que estes potenciais fossem adequadamente conhecidos, seria possível tanto a obtenção de elevado quantitativos de CTs quanto sua diferenciação em qualquer tecido. Neste contexto, tal qual a diversidade de fontes de CTs e métodos de cultivo, são os resultados descritos nesses estudos (DE BARI *et al.*, 2001; SIMONSEN *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2003; OSWALD *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; DEZAWA *et al.*, 2005; MAITRA *et al.*, 2005; MOORE, CAMPBELL, 2005; SATO *et al.*, 2005; SHAHDADFAR *et al.*, 2005; IMREH *et al.*, 2006; JEON *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006; TIMPER *et al.*, 2006; BERNARDO *et al.*, 2007b; BOCHKOV *et al.*, 2007; FORONI *et al.*, 2007; KRAMPERA *et al.*, 2007; LANGE *et al.*, 2007; PĂUNESCU *et al.*, 2007; TOLAR *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; ANGHILERI *et al.*, 2008; BOCHKOV *et al.*, 2008; CATALINA *et al.*, 2008; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2008; IZADPANAH *et al.*, 2008; KUO, TUAN, 2008; TONTI, MANNELLO, 2008; AURICH *et al.*, 2009; BLUM, BENVENISTY, 2009; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2010; TARTE *et al.*, 2010; BEN-DAVID *et al.*, 2011; CRESPO-DIAS *et al.*, 2011; GRUENLOH *et al.*, 2011; IRIODA *et al.*, 2011; RA *et al.*, 2011; BEN-DAVID *et al.*, 2012; DUAİLİBİ *et al.*, 2012; HARRISON, 2012; UEYAMA *et al.*, 2012; BENTIVEGNA *et al.*, 2013; BORGHESI *et al.*, 2013; MANDEL *et al.*, 2013; OTTE *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN *et al.*, 2013).

Em um grande número de publicações da última década, as CTs cultivadas foram caracterizadas dentro de padrões de normalidade, sem a identificação de

qualquer modificação. Nestas publicações há uma significativa variedade de fontes de CTs, tais como CTEs e CTMs isoladas de diferentes tecidos; bem como diferentes períodos de cultivo e parâmetros de análise. Dentre os parâmetros, são frequentes as avaliações do perfil imunofenotípico, do cariótipo e/ou do genoma, da expressão de genes e/ou atividade enzimática específicos, os perfis proliferativo e de diferenciação e, eventualmente, também de transdiferenciação e tumorigênese *in vivo* (DE BARI *et al.*, 2001; OSWALD *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; DEZAWA *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006; TIMPER *et al.*, 2006; BERNARDO *et al.*, 2007b; FORONI *et al.*, 2007; KRAMPERA *et al.*, 2007; LANGE *et al.*, 2007; PĂUNESCU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; ANGHILERI *et al.*, 2008; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008; KUO, TUAN, 2008; AURICH *et al.*, 2009; CRESPO-DIAS *et al.*, 2011; GRUENLOH *et al.*, 2011; RA *et al.*, 2011; OTTE *et al.*, 2013).

Curiosamente, nesta mesma década e com a mesma diversidade de fontes de CTs, períodos de cultivo e/ou parâmetros de análise, também há um grande volume de relatos descrevendo a identificação de diversificadas alterações nesses cultivos. Estas compreendem desde alterações genéticas, como a amplificação ou deleção de *loci*, mudanças no padrão de metilação, na estrutura e/ou número de cromossomos; até alterações fenotípicas, como a expressão de enzimas e/ou CDs, no perfil proliferativo, o potencial de diferenciação e/ou mesmo a morfologia (SIMONSEN *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2003; MAITRA *et al.*, 2005; MOORE, CAMPBELL, 2005; SHAHDADFAR *et al.*, 2005; IMREH *et al.*, 2006; BOCHKOV *et al.*, 2007; TOLAR *et al.*, 2007; BOCHKOV *et al.*, 2008; CATALINA *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2008; IZADPANAH *et al.*, 2008; TONTI, MANNELLO, 2008; BLUM, BENVENISTY, 2009; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2010; TARTE *et al.*, 2010; BEN-DAVID *et al.*, 2011; IRIODA *et al.*, 2011; BEN-DAVID *et al.*, 2012; DUAİLİBI *et al.*, 2012; HARRISON, 2012; UEYAMA *et al.*, 2012; BENTIVEGNA *et al.*, 2013; BORGHESI *et al.*, 2013; MANDEL *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN *et al.*, 2013).

A identificação dessas alterações nos cultivos de CTs, sobretudo naqueles destinados a aplicações terapêuticas, revela a existência de um risco ainda não adequadamente quantificado, o de se transplantar células com potencial tumoral.

Este risco se estabelece em razão de várias alterações relatadas nos cultivos de CTs terem sido originalmente caracterizadas como marcadores típicos de células tumorais (BURNS *et al.*, 2005; MAITRA *et al.*, 2005; CLARKE, FULLER, 2006; IMREH *et al.*, 2006; TOLAR *et al.*, 2007; BOCHKOV *et al.*, 2008; BOVERI, 2008; CATALINA *et al.*, 2008; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2008; GRIMES *et al.*, 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MOHRIN *et al.*, 2010; STEPHENSON *et al.*, 2010; TORSVIK *et al.*, 2010; BEN-DAVID *et al.*, 2011; FANG, ZHANG, 2011; JEONG *et al.*, 2011; IRIODA *et al.*, 2011; BEN-DAVID *et al.*, 2012; DUALIBI *et al.*, 2012; HARRISON, 2012; QUAIL *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013; BENTIVEGNA *et al.*, 2013; BORGHESI *et al.*, 2013).

Uma parcela das publicações sobre cultivos de CTs relata não apenas a identificação de alterações *in vitro*, mas também a avaliação do potencial tumorigênico dessas amostras *in vivo*, por meio do seu transplante para modelos animais. Esses estudos também contém significativa diversidade quanto aos métodos utilizados, tanto em função da fonte de CTs, do período e condições de cultivo quanto do animal transplantado, se imunodeficiente ou não. Da mesma forma, os resultados obtidos nesses estudos são sensivelmente divergentes.

Enquanto publicações como as de Tolar *et al.* (2007), Djojotubroto *et al.* (2009), Siebzehrubl *et al.* (2009) e Jeong *et al.* (2011) relatam a formação de tumores *in vivo* a partir da maioria ou totalidade dos cultivos de CTs identificados com alterações cromossômicas e/ou moleculares; os trabalhos de Tarte *et al.* (2010), Roemeling-van Rhijn *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2013b) relatam a detecção de alterações similares nos cultivos, mas sem a formação de tumores *in vivo*.

Atestando a complexidade e consequente dificuldade para o estudo do tema “transformação/potencial tumorigênico(a) do cultivo de CTs”, destacam-se ainda publicações que relataram a identificação de alterações e transformações dos cultivos, demonstradas inclusive pela formação de tumores *in vivo*; mas que posteriormente foram retratadas, atribuindo-se a transformação “observada” a contaminações dos cultivos por linhagens celulares reconhecidamente tumorais. Enquadram-se nesta condição os trabalhos de Rubio *et al.* (2005) e Røslund *et al.* (2009), retratados respectivamente por de la Fuente *et al.* (2010) e Torsvik *et al.* (2010).

2.3.2 Intervenções nos cultivos visando a redução da ocorrência de alterações

Considerando a transformação celular um dos resultados possíveis da falha na homeostase da proliferação e/ou diferenciação celular, e que esta falha pode decorrer de alterações induzidas por fatores do ambiente celular, há também um número significativo de publicações nas quais foi avaliada a putativa influência de fatores específicos e outras que descrevem modificações dos parâmetros/componentes habituais de cultivo e seus efeitos sobre a ocorrência de alterações (ANDREWS, 2002; BUZZARD *et al.*, 2004; MAITRA *et al.*, 2005; CLARKE, FULLER, 2006; SOTIROPOULOU *et al.*, 2006; BERNARDO *et al.*, 2007b; FORONI *et al.*, 2007; CATALINA *et al.*, 2008; MEZA-ZEPEDA *et al.*, 2008; BERNARDO *et al.*, 2009; BLUM, BENVEISTY 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MOHRIN *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2011; GREAVES, MALEY, 2012; STRIOGA *et al.*, 2012; MANDEL *et al.*, 2013).

Um dos componentes cuja modificação é mais frequente é o soro utilizado na suplementação do meio de cultivo. Habitualmente de origem heteróloga, a motivação para sua substituição decorre não apenas da putativa contribuição à ocorrência de alteração celular, mas também devido ao risco potencial da transmissão de príons e/ou zoonoses pouco conhecidas ou ainda da indução de reação imunológica. Neste intuito, há relatos nos quais o soro heterólogo foi substituído por soro autólogo ou alogênico; e também da utilização de meio de cultivo suplementado com fatores de crescimento específicos ao invés de soro (BERNARDO *et al.*, 2009; STRIOGA *et al.*, 2013).

Até o presente o momento, os relatos indicam a obtenção de resultados similares para os cultivos de CTs nessas diferentes condições, tanto em relação aos parâmetros morfológicos e imunofenotípicos, quanto em relação à capacidade proliferativa e de diferenciação (SHAHDADFAR *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*, 2006; BERNARDO *et al.*, 2007a; FANG *et al.*, 2007; MESIMÄKI *et al.*, 2009; PÉREZ-ILZARBE *et al.*, 2009; VON BONIN *et al.*, 2009; LINDROOS *et al.*, 2010; VANIKAR *et al.*, 2010; BONNAMAIN *et al.*, 2013; DEMERDASH *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014). Dentre as poucas diferenças observadas, pode-se indicar potencial

relevância para a expressão diferencial de genes em CTs cultivadas com SFB ou autólogo humano, identificada por Shahdadfar *et al.* (2005) e Lindroos *et al.* (2010)

Outro fator cuja potencial influência sobre a ocorrência de alterações nas células do cultivo tem sido frequentemente investigado é a tensão de oxigênio. Sua relevância seria decorrente do fato de o material genético ser significativamente sensível a danos oxidativos. A análise dos resultados dos estudos comparativos entre cultivos de CTs em condições de hipóxia ($[O_2] \leq 5\%$) e convencionais de cultivo ($[O_2] \cong 20\%$), indicam efeitos evidentes sobre o metabolismo mitocondrial de carboidratos e aminoácidos (HOLZWARTH *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2011; FORRISTAL *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013b; CHRISTENSEN *et al.*, 2014).

Quanto aos aspectos morfológicos, imunofenotípicos e/ou os potenciais de proliferação e diferenciação dos cultivos, os relatos envolvendo variações na tensão de oxigênio são ainda controversos. Enquanto os trabalhos de Duguez *et al.* (2012), Oliveira *et al.* (2012), Bath *et al.* (2013) e Berniakovich e Giorgio (2013) relataram o favorecimento do status indiferenciado e baixa proliferação celular em condições de hipóxia; os trabalhos de Knuth *et al.* (2013), Liu *et al.* (2013) e Chung *et al.* (2014) descreveram maiores taxas de diferenciação e expressão de genes associados à diferenciação, nas mesmas condições de hipóxia.

Curiosamente, Yamamoto *et al.* (2013) relataram a manutenção do status indiferenciado combinada ao aumento na proliferação de CTAs quando cultivadas em hipóxia. Neste controverso contexto, há aparente consenso quanto ao fato de que a manutenção da tensão de oxigênio em valor inferior ou igual a 5% nos cultivos, possibilitaria mimetizar mais adequadamente as condições fisiológicas de origem, em especial das CTAs, favorecendo seu metabolismo natural, do qual fazem parte diversos mecanismos de reparos do material genético (HOLZWARTH *et al.*, 2010; BASCIANO *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2011; DUGUEZ *et al.*, 2012; ESTRADA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; BATH *et al.*, 2013; BERNIAKOVICH, GIORGIO, 2013; FORRISTAL *et al.* 2013; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013b; CHRISTENSEN *et al.*, 2014).

Há também publicações indicando a potencial influência de outros fatores do cultivo, como a densidade celular nos inóculos, sendo aqueles com menor

densidade indicados como os mais propensos à acumularem alterações (DJOJOSUBROTO *et al.*, 2009).

2.3.3 Consensos sobre o cultivo de CTs

Em face à diversidade e relativa controvérsia das informações disponíveis sobre os cultivos de CTs, poucos aspectos se mostram consensuais. Um destes, seguramente incontestável, é a necessidade de se aplicar princípios de boas práticas laboratoriais em todas as etapas do estudo, desde a obtenção da amostra à avaliação dos transplantes realizados (HARTUNG *et al.*, 2002; COECKE *et al.*, 2005; DE LA FUENTE *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; TORSVIK *et al.*, 2010; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Também há concordância quanto ao conceito de que condições fisiológicas e/ou de cultivo “estressantes” podem se configurar fatores causais de alterações. Contudo, o detalhamento das condições que poderiam ser caracterizadas como estressantes não é consensual. Isto torna mandatória a documentação detalhada dos parâmetros utilizados nos cultivos, sobretudo nos casos nos quais forem identificadas alterações (STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Outro aspecto consensual, especialmente para os cultivos de CTAs, é o fato de que os procedimentos para seu isolamento do tecido, fornecem uma população heterogênea, mesmo após o período de adesão aos frasco de cultivo. Esta população seria formada tanto por CTMs e sua progênie, quanto possivelmente por células senescentes. Neste conjunto podem ter lugar células com diferentes potenciais para o desenvolvimento de alterações e, eventualmente, mesmo células já portando alterações, as quais poderão se tornar mais numerosas no cultivo (STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Adicionalmente, no contexto em que a identificação de alterações em um cultivo, *per si*, não é determinante da sua malignidade *in vivo*, outro aspecto consensual é a necessidade do estabelecimento de métodos que permitam monitorar eficientemente os cultivos e revelar informações que possam contribuir com o entendimento da relação entre tipos de alterações e seu potencial transformante (TOLAR *et al.*, 2007; DJOJOSUBROTO *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL

et al., 2009; TARTE *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013b; WANG *et al.*, 2013; BARKHOLT *et al.*, 2013).

2.3.4 Questões teórico-práticas sobre a divisão celular de CTs

A manutenção da população de CTs em um tecido adulto, em termos quantitativos, é descrita por meio de dois modelos teóricos sobre a divisão destas células: o de divisão celular assimétrica e o de divisão simétrica. Simplificadamente, ao se dividir assimetricamente, uma CTM forma uma nova CTM e uma célula precursora; enquanto ao se dividir simetricamente, uma CTM forma duas CTMs ou duas células precursoras (MORRISON, KIMBLE, 2006; SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013).

Em princípio, o modelo de divisão assimétrica poderia garantir a existência de um *pool* constante de CTM no tecido; contudo, não é compatível com o aumento do número destas células, fato observado quando da ocorrência de uma lesão no tecido. Este aumento pode ser explicado apenas na ocorrência de divisões simétricas (HORMOZ, 2013; SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013).

Outra diferença entre os modelos, e provavelmente a mais relevante, é o nível onde se dá o controle homeostático entre diferenciação e proliferação. Mesmo que resultante certamente da interação entre fatores do microambiente celular e outros intrínsecos às próprias CTM, assume-se no modelo assimétrico que o controle ocorre no nível individual celular, sendo cada CTM responsável por “decidir” o momento da divisão. Já, no modelo simétrico, o controle exibiria mecanismos mais determinantes no nível populacional que individual (SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013).

Ambos os modelos têm demonstrações experimentais que lhes dão respaldo, mesmo apresentando, à exemplo de outros temas já descritos neste trabalho, relatos controversos. Considera-se hoje que os dois modelos não são mutuamente excludentes, coexistindo ambos os tipos de divisões nas populações de CTM *in vivo*, podendo uma ou outra ser favorecida em condições fisiológicas

distintas (WERNER *et al.*, 2011; HORMOZ, 2013; SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013; WERNER *et al.*, 2013).

Desta forma, acrescenta-se à heterogeneidade da população de CTMs obtida no isolamento, já descrita em seção anterior, a possibilidade de que estas células apresentem distintos padrões de homeostase da sua proliferação *in vitro*. A princípio, este fato não teria efeitos sobre a probabilidade de uma célula adquirir uma alteração, mas certamente teria implicações sobre a probabilidade de permanência desta célula no cultivo e portanto, sobre o acúmulo de alterações (ASHKENAZI *et al.*, 2008; WERNER *et al.*, 2011; SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013; WERNER *et al.*, 2013;).

Há vários trabalhos teóricos explorando os possíveis efeitos do predomínio de um tipo ou outro de divisão nos cultivos, e de que forma e em qual intensidade que poderiam interferir na probabilidade do acúmulo de alterações em uma dada progênie celular. Porém, até o momento, não há dados experimentais suficientes corroborando, ou mesmo contrariando essas simulações, devendo este tema se tornar ainda mais frequente na literatura sobre o cultivo de CTs (ASHKENAZI *et al.*, 2008; WERNER *et al.*, 2011; SHAHRIYARI, KOMAROVA, 2013; WERNER *et al.*, 2013).

2.3.5 Células-tronco do câncer?

Outro fator motivador de debate na literatura sobre células-tronco e câncer é a caracterização de que em muitos tumores, principalmente os sólidos, apenas uma fração celular tem a capacidade de promover sua manutenção e propagação, bem como iniciar um novo tumor quando transplantada. Esta fração celular exhibe propriedades semelhantes às das CTs e por isso tem sido denominada de células-tronco do câncer (CTCs) (BEN-PORATH *et al.*, 2008; QUINTANA *et al.*, 2008; LATHIA *et al.*, 2011).

O principal ponto do debate diz respeito à origem das CTCs. Estas seriam de fato CTs com homeostase anormal dos processos de proliferação e diferenciação ou células somáticas que adquiriram características similares às das CTs? (LOBO *et al.*, 2008). Apesar do grande volume de trabalhos experimentais inclinados sobre

esta questão, as respostas são ainda bastante divergentes (FANG *et al.*, 2005; GIL-PEROTIN *et al.*, 2006; KRIVTSOV *et al.*, 2006; TAVIL *et al.*, 2006; RICCI-VITIANI *et al.*, 2007).

Independentemente de haver ou não consenso quanto à origem das CTCs porém, sua identificação e crescente caracterização nos tumores tem indicado novas possibilidades de intervenções terapêuticas, mantendo seu estudo em evidência (BEN-PORATH *et al.*, 2008; QUINTANA *et al.*, 2008; LATHIA *et al.*, 2011; KLEFFEL, SCHATTON, 2013; PARK *et al.*, 2014).

2.4 MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE DOS CULTIVOS DE CTMs

Diante do exposto, certamente é clara a necessidade de se estabelecer métodos que possibilitem mensurar a segurança do uso de CTMs em terapias, mesmo que estas células não sejam submetidas à expansão *in vitro*. Assim, vários testes empregados originariamente a outros tipos celulares ou finalidades específicas podem ser aplicados, como o teste de Papanicolaou, a avaliação citogenética (convencional/cariotipagem e molecular), a caracterização imunofenotípica, de diferenciação e do potencial tumorigênico *in vivo*.

2.4.1 Teste de Papanicolaou

Descrito por George Papanicolaou na década de 1920, o teste batizado com seu nome consiste de um método de coloração desenvolvido originalmente para a avaliação de células obtidas da cérvix uterina. Por este teste é possível a identificação de alterações citoplasmáticas e/ou nucleares típicas de células neoplásicas (SMITH *et al.*, 2003; MUNTEAN, 2009).

Neste teste a análise das células é realizada a partir do preparo de um esfregaço, no qual as células são dispostas em uma fina camada sobre uma lâmina de vidro e então fixadas. Após a fixação, é realizada sua coloração, pela combinação de um corante nuclear, a hematoxilina, e uma mistura de dois corantes citoplasmáticos, *orange G* e *EA-51* (NAIB, 1990; MUNTEAN, 2009).

Esta combinação de corantes possibilita revelar aspectos celulares fundamentais para a identificação de células neoplásicas. Estes aspectos incluem características nucleares como pigmentação, posição, volume e morfologia; características de membrana nuclear, como regularidade e integridade, além da organização da cromatina. Quanto ao citoplasma, avalia-se a presença, proporção e volume de vacúolos e grânulos, a formação de sincício, além da ocorrência de queratinização. Alterações nos padrões destes parâmetros sugerem a existência de anormalidades (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; NANDA *et al.*, 2000; APGAR *et al.*, 2003).

A aplicação deste teste em cultivos de CTMs foi proposta recentemente por Irioda *et al.* (2011), que documentaram a identificação de alterações morfológicas em cultivos de CTMAs humanas, similares àquelas identificadas em células tumorais e pré-tumorais de exames da cérvix uterina.

2.4.2 Citogenética

2.4.2.1 Citogenética convencional: cariotipagem

A técnica citogenética de cariotipagem, em especial por bandamento G (ou GTG), foi desenvolvida na década de 1970 e ainda se caracteriza como um método de grande eficiência na detecção de alterações cromossômicas numéricas e estruturais (SCHERES, 1972; GERSEN, KEAGLE, 1999; FERREIRA, 2005; HOWE *et al.*, 2014).

Somada à relativa facilidade de execução e baixo custo, a análise citogenética ainda é um exame subsidiário de rotina para diagnóstico de vários fenótipos específicos, sendo também aplicada para investigação de pacientes com manifestações clínicas inespecíficas (HOOK, 1978; BASEL, 1995; STRACHAN, READ, 2003; FERREIRA, 2005; LICHTENBELT *et al.*, 2011).

O bandamento G é apresentado com frequência nos estudos sobre o risco de transformação de CTs em cultivo e sua aplicação no monitoramento destes cultivos, em especial nos estudos pré-clínicos, tem sido fortemente recomendado (BUZZARD *et al.*, 2004; RUBIO *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; BOCHCKOV *et al.*, 2007; BEN-DAVID, BENVENISTY, 2008; CHOUMERIANOU *et*

al., 2008; IZADPANAHA *et al.*, 2008; BOCHKOV *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; TARTE *et al.*, 2010; CRESPO-DIAZ *et al.*, 2011; JEONG *et al.*, 2011; POLONI *et al.*, 2011; DUAİLİBI *et al.*, 2012; MUNTÍÓN *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013; HUWANG *et al.*, 2013).

2.4.2.2 Citogenética molecular

A citogenética molecular consiste essencialmente na aplicação de métodos de biologia molecular à citogenética convencional. O incremento de ferramentas da biologia molecular à citogenética permitiu significativo aumento na capacidade de resolução e de interpretação cromossômica. Dentre as muitas técnicas desenvolvidas, uma que se tornou amplamente utilizada foi a de hibridação fluorescente *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) (NUTIU *et al.*, 2000; HENQ *et al.*, 2003).

A técnica de FISH permite detectar a presença de sequências de DNA em cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, tecidos, células isoladas e mesmo gametas. Isto é possível por meio da utilização de sondas, segmentos de DNA constituídos contendo nucleotídeos modificados pela incorporação de fluorocromos. Ao serem aplicadas sobre um material alvo, permitem concluir sobre a presença e localização do DNA complementar (NUTIU *et al.*, 2000; HENQ *et al.*, 2003; FERREIRA, 2005).

Quando conjugada ao cariótipo por banda G, a técnica de FISH confere maior segurança à avaliação citogenética pois, ao possibilitar a inclusão de núcleos interfásicos na análise, aumenta o número de células sob avaliação. Neste contexto, a FISH tem se mostrado uma importante ferramenta aplicada também na avaliação de cultivos de CTMs (NUTIU *et al.*, 2000; BERNARDO *et al.*, 2007b; BOCHKOV *et al.*, 2007; 2008; BEN-DAVID, BENVENISTY, 2008; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; CRESPO-DIAZ *et al.*, 2011; JEONG *et al.*, 2011; POLONI *et al.*, 2011; DUAİLİBI *et al.*, 2012; MUNTÍÓN *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

2.4.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo consiste na avaliação de propriedades físico-químicas celulares, durante o deslocamento destas em uma coluna de solução isoeletrolítica. É uma técnica multiparamétrica, na qual se utiliza anticorpos mono/policlonais com marcação fluorescente, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa da expressão de antígenos específicos em populações celulares (JANEWAY *et al.*, 2001).

A diferença nos padrões fenotípicos entre as células, que podem incluir CDs específicos, mistura de CDs de diferentes linhagens celulares, assincronia na sua expressão entre outras, podem ser utilizadas tanto para distinguir células normais de diferentes origens e/ou linhagens como também células transformadas (QUIXABEIRA, SADDI, 2008).

A técnica de citometria de fluxo tem sido amplamente empregada no estudo de CTs, possibilitando a caracterização de diferentes padrões de expressão de inúmeros CDs. Atualmente, encontra-se significativamente bem caracterizados os perfis de expressão de CTMOs e CTMAs (REYES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003; FESTY *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2005; STREM *et al.*, 2005; DOMINICI *et al.*, 2006; MIZUNO, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012).

2.4.4 Diferenciação celular *in vitro*

Presente invariavelmente em todos os estudos sobre CTs, a etapa de diferenciação celular *in vitro* é a determinante para se atestar a multipotência/pluripotência da amostra celular. Nesta etapa, as CTs recebem estímulos específicos, resultantes habitualmente da modificação química do meio de cultivo, e passam a expressar características moleculares e, posteriormente também morfológicas, típicas de determinado tecido adulto (DOMINICI *et al.*, 2006).

Para as CTMs em especial, recomenda-se a indução da sua diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos para atestar sua multipotência (DOMINICI *et al.*, 2006). Entretanto, pode-se encontrar uma diversidade de relatos da diferenciação de CTMs, compreendendo tecidos derivados de cada um dos

folhetos embrionários, tais como os de origem mesodérmica: músculo liso, estriado esquelético e cardíaco, tendões e endotélio (OSWALD *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; DEZAWA *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2006; KUO, TUAN, 2008); de origem ectodérmica, como neurônios (KRAMPERA *et al.*, 2007; ANGHILERI *et al.*, 2008); e de origem endodérmica, como diversos epitélios (SATO *et al.*, 2005; TIMPER *et al.*, 2006; PĂUNESCU *et al.*, 2007; AURICH *et al.*, 2009).

2.4.5 Potencial tumorigênico *in vivo*

A avaliação do potencial tumorigênico *in vivo* é uma das abordagens que compõem o estudo pré-clínico em terapia celular. Nesta fase de estudo, avalia-se não apenas os eventuais riscos de uma nova terapia, mas também o seu potencial terapêutico, possibilitando mensurar a eficiência de diferentes tipos celulares, composição de inóculo, quantidades de células, vias e/ou momentos de inoculação, bem como do seguimento pós-transplante (VAN DER SPOEL *et al.*, 2011; BARKHOLT *et al.* 2013).

Desta forma, o teste *in vivo* se configura etapa obrigatória nos estudos pré-clínicos. No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde, por meio da Resolução nº 466/12, de 12 de Dezembro de 2012, determina sua realização em todos os procedimentos destinados aos seres humanos, cuja aceitação não esteja ainda consagrada na literatura científica (BRASIL, 2012).

A maioria dos estudos pré-clínicos com CTMs é realizada em roedores, principalmente em *Mus* e *Rattus*. Assim, grande parte do conhecimento acumulado sobre a biologia das CTMs e seu potencial terapêutico é proveniente de estudos nesses modelos animais (DAMY *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

2.5 MURINOS COMO MODELOS DE ESTUDOS DE CTMs

A investigação sobre o potencial terapêutico de CTMs tem produzido em anos recentes, um acúmulo de estudos em modelos animais de maior porte, como

cães, porcos, ovelhas e mesmo cavalos. Contudo, o número de estudos nos quais roedores são utilizados, em especial *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, ainda é substancialmente maior. Isto decorre tanto de fatores relacionados diretamente ao manejo desses animais quanto da disponibilidade de linhagens, métodos e insumos padronizados (CHANG *et al.*, 2008; GIMBLE *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2013).

A avaliação da segurança clínica do uso de CTMs em animais saudáveis, bem como da eficiência terapêutica em modelos de várias patologias é realizada essencialmente em roedores e já possibilitou a caracterização de inúmeros fatores relevantes ao avanço das pesquisas em terapia celular para as fases clínicas (GIMBLE *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Na Tabela 2 encontram-se listadas patologias com diferentes graus de comprometimento clínico, para as quais há modelos animais em *Mus* e/ou *Rattus*, e exemplos de estudos da avaliação do potencial terapêutico de CTMAs.

TABELA 2 – PATOLOGIAS COM MODELOS EXPERIMENTAIS EM *Mus* E/OU *Rattus* E EXEMPLOS DE ESTUDOS DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CTMA.

Patologia	Modelo animal	Referência(s)
Acidente vascular cerebral hemorrágico	<i>Rattus</i>	Kim <i>et al.</i> (2007)
Acidente vascular cerebral isquêmico agudo	<i>Rattus</i>	Leu <i>et al.</i> (2010)
Artrite autoimune induzida	<i>Mus</i>	González <i>et al.</i> (2009)
Defeitos ósseos	<i>Mus</i> , <i>Rattus</i>	Cowan <i>et al.</i> (2004)
Diabetes tipo 1	<i>Mus</i> , <i>Rattus</i>	Chandra <i>et al.</i> (2009), Lin <i>et al.</i> (2009c)
Disfunção erétil	<i>Rattus</i>	Lin <i>et al.</i> (2009a)
Distrofia muscular	<i>Mus</i>	Di Rocco <i>et al.</i> (2006)
Doença de Crohn	<i>Mus</i>	González <i>et al.</i> (2009)
Doença de Huntington	<i>Rattus</i>	Lee <i>et al.</i> (2009)
Encefalomielite autoimune experimental	<i>Mus</i>	Constantin <i>et al.</i> (2009)
Hipertensão arterial pulmonar	<i>Rattus</i>	Umar <i>et al.</i> (2009), Liu <i>et al.</i> (2011)
Incontinência urinária	<i>Rattus</i>	Lin <i>et al.</i> (2009b)
Infarto do miocárdio	<i>Mus</i> , <i>Rattus</i>	Bai <i>et al.</i> (2010), Schenke-Layland <i>et al.</i> (2009)
Isquemia de membro	<i>Mus</i>	Moon <i>et al.</i> (2006)
Lesão medular	<i>Rattus</i>	Kang <i>et al.</i> (2006)
Lesão de nervo periférico	<i>Rattus</i>	Di Summa <i>et al.</i> (2010)
Lesão hepática	<i>Mus</i>	Banas <i>et al.</i> (2009)
Lesão renal isquêmica	<i>Rattus</i>	Chen <i>et al.</i> (2011)
Lúpus eritematoso	<i>Mus</i>	Choi <i>et al.</i> (2012)

continua

TABELA 2 – PATOLOGIAS COM MODELOS EXPERIMENTAIS EM *Mus* E/OU *Rattus* E EXEMPLOS DE ESTUDOS DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CTMA.

Patologia	Modelo animal	Referência(s)	conclusão
Rinite alérgica	<i>Mus</i>	Cho <i>et al.</i> (2009)	
Sepsis	<i>Mus</i>	Gonzalez-Rey <i>et al.</i> (2009)	
Transplante de órgão (fígado)	<i>Rattus</i>	Wan <i>et al.</i> (2008)	
Úlceras dérmicas	<i>Mus</i>	Ebrahimian <i>et al.</i> (2009)	

3. JUSTIFICATIVAS

O conhecimento atual sobre a biologia das CTMOs e CTMAs as colocam na iminência da efetiva utilização terapêutica. Porém, as questões referentes à segurança do paciente em relação ao material transplantado têm se mostrado tão ou mais relevantes clinicamente que as referentes à diferenciação celular propriamente dita.

A preocupação maior é quanto à estabilidade das CTMs e dos possíveis efeitos deletérios do cultivo celular, sobretudo quanto à possibilidade de transformação. Uma das formas de se mensurar tais efeitos e tentar determinar a segurança de um transplante é investigar a ocorrência de alterações morfológicas, citogenéticas e/ou imunofenotípicas, uma vez que mudanças nestes parâmetros são comuns em células tumorais.

Os muitos relatos publicados, tanto descrevendo a ocorrência de alterações em CTMs cultivadas, quanto a manutenção da normalidade, são consensuais quanto à necessidade de se atestar a segurança destas células para o uso clínico. Contudo, não há consenso quanto aos métodos e parâmetros mais adequados para se alcançar tal objetivo.

Os relatos controversos e, em alguns casos, contraditórios sobre o cultivo e aplicação terapêutica de CTMs, tornam urgente o desenvolvimento de algoritmos de controle de qualidade para o desenvolvimento das pesquisas pré-clínicas para sua futura transferência para fases clínicas de estudo.

No Brasil, a Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012) preconiza que, todo procedimento envolvendo seres humanos, cuja aceitação não esteja ainda consagrada na literatura científica, caso evidente do uso das CTMs, é considerada pesquisa clínica e, portanto, deve estar fundamentada em experimentação prévia, a qual deve ser realizada em animais.

Neste contexto e apoiado na experiência acumulada pelo grupo de pesquisa (BROFMAN *et al.*, 2004; GUARITA-SOUZA *et al.*, 2004; GUARITA-SOUZA *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008a; 2008b; 2008c; IRIODA *et al.*, 2011), foram selecionadas as CTMAs epididimais obtidas de *Mus musculus* linhagem Swiss (Rodentia, Mammalia) para o desenvolvimento do presente estudo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de diferentes métodos de detecção de alterações celulares para triagem de células-tronco mesenquimais cultivadas para terapias derivadas do tecido adiposo de origem epididimal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Isolar CTMAs a partir do tecido adiposo epididimal de dez exemplares de *Mus musculus* linhagem Swiss e cultivá-las até P15.
- 4.2.2 Caracterizar o tempo de duplicação e período de crescimento exponencial de amostras de CTMAs em cultivos de curta (P3) e longa duração (P15).
- 4.2.3 Comparar o perfil cinético de crescimento populacional de amostras de CTMA em P3 e P15.
- 4.2.4 Aplicar a técnica de Papanicolaou na avaliação das amostras de CTMAs cultivadas em P3, P9 e P15.
- 4.2.5 Aplicar a técnica de cariotipagem (bandamento G) na avaliação das amostras de CTMAs cultivadas em P3, P9 e P15.
- 4.2.6 Produzir sondas a partir de clones do genoma de *Mus musculus* para uso na técnica de FISH.
- 4.2.7 Aplicar a técnica de FISH na avaliação das amostras de CTMAs cultivadas em P3, P9 e P15.
- 4.2.8 Aplicar a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo na caracterização das amostras de CTMAs cultivadas em P15.
- 4.2.9 Induzir a diferenciação osteogênica e adipogênica das amostras de CTMAs cultivadas em P15.
- 4.2.10 Testar o potencial tumorigênico *in vivo* das amostras de CTMAs cultivadas em P15.

- 4.2.11 Quantificar as alterações identificadas por meio de cada técnica de avaliação para cada amostra e passagem.
- 4.2.12 Comparar os tipos e frequência de alterações identificadas por meio das diferentes técnicas para cada amostra e passagem.
- 4.2.13 Avaliar a correlação estatística entre os resultados obtidos e o potencial tumorigênico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados tiveram aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA/Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, por meio dos certificados de número 525/2011 e 710/2013 (Anexos 1 e 2). À exceção da análise histopatológica, todos os procedimentos foram realizados nas dependências do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, utilizando-se princípios de boas práticas laboratoriais no cultivo celular (HARTUNG *et al.*, 2002; COECKE *et al.*, 2005).

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1.1 Planejamento do estudo

No presente estudo, planejou-se a avaliação do cultivo de CTMAs de origem epididimal de dez amostras, em três níveis distintos: P3 (“-1”, cultivo de curta duração), P9 (“0”, caracterização controversa como de curta/longa duração) e P15 (“+1”, cultivo de longa duração). As amostras foram avaliadas segundo aspectos citológicos, citogenéticos e imunofenotípicos nos três níveis.

Nos níveis -1 e +1 as amostras foram também caracterizadas quanto ao perfil de crescimento celular e neste último, também quanto à potencialidade de diferenciação e tumorigênese *in vivo* (FIGURA 1).

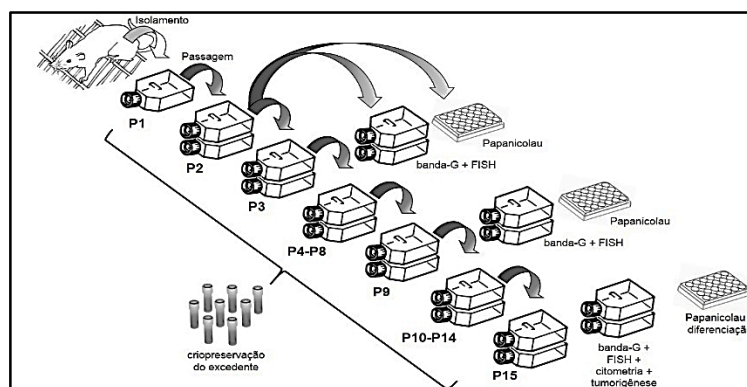


FIGURA 1 – VISÃO GERAL DO DELINEAMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL.
FONTE: O autor (2013).

5.1.2 Análise estatística

Os métodos utilizados para avaliação dos cultivos nos três níveis tiveram seus resultados expressos sob a forma de médias percentuais acompanhadas de seus respectivos desvios padrões. Estas médias foram comparadas entre amostras e níveis, por meio de análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, considerando valores de α iguais a 0,05 e 0,01, por meio da utilização do software GraphPad Prism® 6.0 (versão de teste).

A avaliação da potencialidade de diferenciação e tumorigênese *in vivo* tiveram seus resultados expressos como positivo ou negativo, enquanto a avaliação imunofenotípica teve seus resultados expressos de forma descritiva, considerando a fração da população e a intensidade de expressão do marcador.

A comparação entre os métodos aplicados à avaliação dos cultivos e amostras foi realizada por meio dos testes não paramétricos de correlação de Pearson, Wilcoxon e qui-quadrado.

5.2 MODELO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram utilizados para obtenção de CTMAs, dez camundongos machos (*Mus musculus* linhagem Swiss) com aparência saudável, idade de $99,70 \pm 3,26$ dias, pesando $39,09 \pm 7,62$ g, disponibilizados pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas de contenção (gaiolas) (CxLxA: 41x34x16 cm) no Biotério do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, com até quatro indivíduos por caixa, com água e ração (Nuvilab CR-1®, Nuvital) *ad libitum*, em ambiente com temperatura e iluminação controlados ($23\pm 2^\circ\text{C}$ e ciclos de luz e escuro de 12/12 h), até a idade de aproximadamente 100 (cem) dias, quando foram então manipulados para a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo epididimal (CTMAs).

5.3 OBTENÇÃO DE CTMAs

Para a obtenção de CTMAs, procedeu-se inicialmente à anestesia, seguida de eutanásia dos animais e posterior remoção cirúrgica do tecido adiposo epididimal para isolamento dessas células, conforme procedimentos descritos a seguir:

5.3.1 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral por meio da administração da associação de $200\text{ mg}\times\text{kg}^{-1}$ de ketamina (Vetanarcol®, Köning) e $16\text{ mg}\times\text{kg}^{-1}$ de xilazina (Anasedan®, *Vet Brands International*) por via intraperitoneal. A constatação do efeito anestésico foi realizada por meio da observação da ausência de reflexos neuromusculares. Após, os animais tiveram a região abdominal tricotomizada.

5.3.2 Eutanásia e remoção cirúrgica do tecido adiposo epididimal

Posteriormente à tricotomia, os animais foram submetidos à eutanásia por meio da administração da associação de $600\text{ mg}\times\text{kg}^{-1}$ de ketamina e $48\text{ mg}\times\text{kg}^{-1}$ de xilazina por via intraperitoneal.

Os animais foram então dispostos em decúbito dorsal sobre campo cirúrgico estéril e foi realizada laparotomia longitudinal oblíqua para acessar os epidídimos e o tecido adiposo contíguo. Este foi removido e acondicionado em tubo cônico de 50 mL previamente pesado, contendo: 10 mL de solução tampão fosfato salino (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 13,7 mM, pH 7,4) e 1% de Pen Strep® (Gibco) (V:V) [penicilina-G $5.000\text{ U}\times\text{mL}^{-1}$ e sulfato de estreptomicina $5\text{ mg}\times\text{mL}^{-1}$].

¹ em tampão citrato salino a 0,85% (citrato de sódio 0,2 M e ácido cítrico 0,2 M)] (PBS/PE) a 37° C.

Após o acondicionamento do tecido adiposo, foi realizada nova pesagem dos tubos para determinação da massa de tecido obtida e, após o isolamento, foi calculado o rendimento de células por grama de tecido adiposo epididimal por animal.

5.3.3 Isolamento de CTMAs

O isolamento das células que compõem a fração mesenquimal do tecido adiposo, na qual se encontram as CTMAs foi realizada em câmara de fluxo laminar (cabine de segurança biológica classe II) (TLF®, TROX) utilizando materiais de consumo estéreis. Os procedimentos consistiram em lavagem dos fragmentos do tecido adiposo em PBS/PE a 37° C em tubos cônicos de 15 mL, seguida por centrifugação a 400×g por 10 min (1.600 rpm em centrífuga Excelsa II®, Fanem) (3×); adição de solução de collagenase IA (Sigma-Aldrich) (0,075% em PBS/PE, P:V) na proporção 1:1 (solução de collagenase IA:tecido adiposo, V:V) e incubação a 37° C por 30 min sob agitação (incubadora Termo Shaker®, Fanem); inativação da collagenase IA por meio da adição de meio de cultivo Dulbecco's *Modified Eagle Medium*/Ham's F-12 com L-Glutamina e 3,5 g×L⁻¹ de HEPES [Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico] (DMEM, LGC Biotecnologia®) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), na proporção 1:1 (DMEM:collagenase IA + tecido adiposo digerido, V:V); homogeneização com pipeta e centrifugação a 400×g por 10 min; descarte do sobrenadante e transferência do *pellet* para novo tubo, completando-se o volume de 10 mL com PBS/PE a 37° C e procedendo-se nova homogeneização com pipeta; filtragem em filtro de nylon com microporos de 100 µm (Cell Strainer®, BD Biosciences) e centrifugação do filtrado a 400×g por 10 min; descarte do sobrenadante e suspensão do *pellet* em 5 mL de meio de cultivo DMEM/SFB; amostragem da solução para contagem celular (≤50 µL) e adição de solução de azul de Trypan (0,4% em PBS, P:V) a 37° C à amostra (1:1, V:V) e homogeneização; aplicação de alíquota de 10 µL da diluição obtida em hemocitômetro (câmara de Neubauer) para contagem de células em microscopia de luz (aumento de 100×); e determinação do número de células viáveis isoladas do tecido adiposo (x) por meio da relação obtida entre o número de células não coradas pelo azul de Trypan (n),

identificadas nos quadrantes delimitados do hemocitômetro, e o número de quadrantes utilizados na contagem (y); multiplicada pelo fator de diluição da suspensão do *pellet* (α) em azul de Trypan (convencionalmente 1:1, portanto, $\alpha=2$), pelo volume de meio (β) utilizado para obtenção desta suspensão e pelo fator de correção “10⁴” (número de células/mL), como indicado na equação 1:

$$x = \left(\frac{n}{y}\right) \times \alpha \times \beta \times 10^4 \quad (1)$$

5.4 CULTIVO E CINÉTICA DO CRESCIMENTO POPULACIONAL

As células da fração mesenquimal isoladas do tecido adiposo foram inoculadas em meio DMEM/SFB, à taxa de até 2×10^5 células/cm² em frascos de cultivo de 25 ou 75 cm², consistindo a primeira passagem do cultivo (P1). Os frascos de cultivo foram incubados a 37° C e 5% de CO₂ em incubadora Ultra Safe HF212UV® (Heal Force).

A manutenção dos cultivos foi realizada por meio do monitoramento visual diário da morfologia e confluência celular (adesão ao frasco de cultivo) em microscópio invertido (IBE 2002, Bioval®) e substituição do meio de cultivo a cada 72 h. Quando a confluência observada era estimada em $\cong 85\%$, procedia-se o repique do cultivo (passagens). A troca de meio e o repique foram realizados em câmara de fluxo laminar (cabine de segurança biológica classe II, TLF®, TROX) utilizando materiais de consumo estéreis.

5.4.1 Passagens dos cultivos

A passagem dos cultivos consistiu na remoção das CTMAs dos frascos de cultivo e transferência destas para novos frascos e/ou placas de 6, 12 ou 24 poços conforme etapa do estudo. Isto foi obtido por meio de ação enzimática (tripsina de origem animal) para promoção da perda da adesão celular ao plástico, suspensão das CTMAs em meio DMEM/SFB e utilização destas como inóculo em novos frascos/placas.

Estes procedimentos consistiram na remoção e descarte do meio de cultivo dos frascos/placas, seguida da adição de PBS/PE a 37° C e agitação suave dos frascos/placas e descarte do PBS/PE (3×); adição de solução de tripsina 0,25% (Gibco) a 37° C (200-400 µL/poço para placas e 1 ou 2 mL para frascos de cultivo de 25 ou 75 cm², respectivamente) e incubação por 5 min a 37° C e 5% de CO₂; avaliação visual da morfologia das células em microscópio invertido, para certificação da perda da adesão celular ao frasco; inibição da ação enzimática pela adição de meio DMEM/SFB na proporção 1:1 (V:V); transferência da solução para tubo cônico de 10 mL e centrifugação a 400×g por 10 min; descarte do sobrenadante e suspensão do *pellet* em 5 mL de meio DMEM/SFB a 37° C; determinação do número e proporção de células viáveis (como descrito em 5.3.4); separação de alíquota contendo o número de células adequado ao tipo de frasco e etapa do estudo; transferência destas células para novos frascos e congelamento do excedente celular de cada passagem, como descrito a seguir (item 5.4.2); e identificação dos frascos/placas com o tipo celular (CTMA), número da amostra/animal, passagem (P1, P2, ...) e data do procedimento.

À exceção de P1, na qual a inoculação foi de 2×10⁵ células/cm², nas demais passagens (P2-P15), a densidade celular ao início do cultivo (inóculo) foi de 2×10³ células/cm².

5.4.2 Criopreservação do excedente celular

O excedente celular de cada passagem dos cultivos foi acondicionado em solução crioprotetora na concentração de $\cong 10^6$ células/mL e congelado em nitrogênio líquido para possível utilização posterior. Os procedimentos para congelamento consistiram em: centrifugação da suspensão celular a 400×g por 10 min; descarte do sobrenadante e suspensão do *pellet* em solução constituída de SFB (80%), DMEM (10%) e Dimetilsulfóxido (10%, DMSO, Mallinckrodt Chemicals), em volume adequado à concentração celular indicada; acondicionamento de alíquotas de 1 mL em criotubos estéreis e identificação dos mesmos com o tipo celular (CTMA), número da amostra/animal, número da passagem (P1, P2, ...), concentração celular e data do procedimento; congelamento gradual dos criotubos em minifreezer Nicool LM10® (Air Liquid) contendo N₂ líquido, mantendo-se o minifreezer no nível 3 de funcionamento ($\cong -20$ °C) por 15 min, no nível 5 ($\cong -70$ °C)

por 45min e no nível 9 ($\cong -110\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 10 min; acondicionamento dos criotubos em botijão de N_2 líquido.

5.4.3 Cinética do crescimento celular

A avaliação da cinética do crescimento de CTMAs em P3 e P15 foi realizada a partir do sorteio de três amostras de CTMAs em cada nível, as quais foram acompanhadas diariamente durante quinze dias.

As amostras foram inoculadas em placas de cultivo de 12 poços, à densidade de 2×10^3 células/ cm^2 . Para cada amostra foi determinado o número de células viáveis de dois poços aleatórios, em intervalos de 24 h de cultivo, utilizando-se dos seguintes procedimentos: remoção e descarte do meio de cultivo; adição de PBS/PE a 37°C seguida de agitação suave da placa e descarte do PBS/PE (3x); adição de 200 μL /poço solução de tripsina 0,25% a 37°C ; incubação por 5 min a 37°C e 5% de CO_2 ; avaliação visual da morfologia das células em microscópio invertido, para certificação da perda da adesão celular ao frasco; inibição da ação enzimática pela adição de meio DMEM/SFB (800 μL /poço); amostragem da solução para contagem celular e determinação do número e proporção de células viáveis como descrito no item 5.3.4.

Ao final do período de análise, obteve-se o valor do \ln correspondente ao número médio de células viáveis de cada amostra a cada 24 h, identificando-se assim o período de crescimento exponencial. A partir da equação da reta ajustada para este período, identificou-se o coeficiente de crescimento específico de cada amostra (k , coeficiente angular da reta):

$$y = kx + n \quad (2)$$

Com base no valor obtido para o crescimento específico, determinou-se o tempo de duplicação (k) a partir da equação a seguir:

$$td = \frac{\ln 2}{K} \quad (3)$$

5.5 ANÁLISES DAS CTMAs CULTIVADAS

As CTMAs cultivadas foram avaliadas por meio de aspectos morfológicos, em especial quanto à morfologia nuclear, por meio da técnica de coloração de Papanicolau; quanto à estabilidade de cariótipo, por meio das técnicas de cariotipagem por bandamento G e FISH; aspectos fenotípicos, por meio das técnicas de citometria de fluxo e diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*; e quanto ao potencial tumorigênico *in vivo*, por meio da inoculação em camundongos da linhagem NOD.CB17-Prkdc(scid)/J.

As análises foram realizadas nas passagens P3, P9 e P15. As técnicas de Papanicolau, cariotipagem por bandamento G e FISH foram aplicadas aos cultivos de todas as amostras em P3 e em P9; bem como em todas as amostras cultivadas até P15. Nesta passagem as amostras foram avaliadas também por meio das técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo, diferenciação celular adipogênica e osteogênica e de avaliação do potencial tumorigênico *in vivo*.

A diferenciação celular e a avaliação do potencial tumorigênico da amostra A2 foram realizadas em P13, enquanto a técnica de citometria de fluxo foi realizada nesta passagem e também em alíquotas criopreservadas em P9 e P3. Já para a amostra A3, a avaliação do potencial tumorigênico foi realizada em P10, assim como a citometria de fluxo, que também foi realizada em alíquotas criopreservadas em P9 e P3. Para a amostra A3 não foi realizada a indução de diferenciação celular.

Para a avaliação por meio das técnicas de coloração de Papanicolau e potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica, as CTMAs foram inoculadas em placas de cultivo de 12 poços e sua adesão à superfície de crescimento foi mantida mesmo após atingirem $\cong 85\%$ de confluência. Para as demais técnicas, as CTMAs foram inoculadas em frascos de cultivo de 75 cm² e, ao atingirem $\cong 85\%$ de confluência, foram removidas dos respectivos frascos.

5.5.1 Técnica de coloração de Papanicolaou

Após os cultivos atingirem confluência de $\cong 85\%$, o meio de cultivo foi removido das placas e descartado e os poços foram lavados com PBS a 37° C (3×). Após, as placas foram coradas com hematoxilina de Harris, Orange G6 e EA36,

constantes do kit para citologia esfoliativa Conjunto Papanicolaou® (Newprov). Os procedimentos foram repetidos para cada poço, em temperatura ambiente.

Esta coloração foi realizada por meio da remoção e descarte do PBS; incubação com etanol a 80%, 70%, 50% e água destilada, por 2 min cada. Após remoção e descarte da água, adicionou-se 1 mL do corante hematoxilina de Harris, incubando-se por 2 min. As placas foram acondicionadas em copo do tipo Becker (1000 mL) e enxaguadas em água corrente por 10 min. O excedente de água foi removido e procedeu-se à incubação com etanol a 50%, 70%, 80% e 96%, por 2 min cada. Após o descarte do etanol a 96%, adicionou-se 1 mL do corante Orange G6, incubando-se por 2 min. Este corante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol a 96%, incubando-se por 2 min (2×). Após, adicionou-se 1 mL do corante EA36, incubando-se por 2 min. Os poços foram então incubados três vezes com etanol a 96%, por 2 min cada.

Depois de secas, as placas foram submetidas à análise por microscopia, realizada inicialmente em microscópio invertido, com posterior captura de imagens realizada em microscópio Olympus BX51, acoplado à câmera digital DP70 e *software* DP70-BSW. Para cada amostra foram capturadas imagens de, ao menos, dez campos visuais com aumento de 200×, totalizando no mínimo, 200 células por amostra e passagem.

5.5.2 Citogenética: Cariotipagem por bandamento G

Quando identificada confluência de $\cong 85\%$ nos frascos, foi adicionado colcemide à concentração de $0,05 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ao meio de cultivo e procedeu-se à incubação por 8 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após, procedeu-se à remoção e descarte do meio de cultivo, seguida da adição de PBS/PE a 37°C e agitação suave e descarte do PBS/PE (3×). Adicionou-se 1 mL de solução de tripsina 0,25% a 37°C e o frasco foi incubado por 5 min a 37°C e 5% de CO_2 ; realizou-se a avaliação visual da morfologia das células em microscópio invertido, para certificação da perda da adesão celular ao frasco e após, foi realizada inibição da ação enzimática pela adição de meio DMEM/SFB na proporção 1:1 (V:V); a suspensão celular foi transferida para tubo cônico de 10 mL e centrifugada a $400 \times g$ por 10 min. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi solubilizado em 10 mL de solução de KCl 75 mM a 37°C e incubado a 37°C por 10 min; adicionou-se 5 gotas de fixador Carnoy

gelado (metanol:ácido acético, 3:1, V:V) e procedeu-se a centrifugação a 400×g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi solubilizado em 10 mL de fixador Carnoy gelado e incubado à temperatura ambiente por 15 min, seguido de nova centrifugação a 400×g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado em 500 µL de fixador Carnoy gelado e armazenamento a 4° C, até sua utilização na montagem das lâminas. Esta montagem consistiu na aplicação de 30 µL dessa solução em lâmina de microscopia.

Estas lâminas foram mantidas a 37° C por \cong 48 h e armazenadas em temperatura ambiente até sua coloração. Esta foi realizada por meio da imersão da lâmina em solução de tripsina 2,5% (Trypsin-EDTA 10×®, Gibco, V:V) em cloreto de sódio 0,9% (NaCl, P:V) a 37° C por 60s, seguido dos seguintes procedimentos em temperatura ambiente: enxágue em solução de NaCl 0,9% (2×); imersão em solução de Giemsa 5% (KaryoMax®, Gibco, V:V), acetona 1% (V:V) em solução tampão de Gurrs (NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM), pH 6,8, por 5 min; enxágue em solução tampão de Gurrs, pH 6,8 (2×); secagem; e fotodocumentação em microscópio Olympus BX51 com câmera digital DP70 acoplada e *software* DP70-BSW.

5.5.3 FISH

As sondas utilizadas na técnica de FISH foram produzidas por meio da marcação de sequências genômicas de *Mus musculus*, extraídas de cultivos de cepas DH10B de *Escherichia coli* (clones) provenientes da biblioteca genômica RPCI-23, do Instituto de Pesquisa do Hospital Infantil de Oakland – EUA (*Children's Hospital Oakland Research Institute* – CHORI, USA).

Os clones foram selecionados a partir de revisão bibliográfica, realizada nas bases de dados *Pubmed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) e do Instituto Europeu de Bioinformática (*European Bioinformatics Institute* – www.ensembl.org), visando a identificação de sequências genômicas de *Mus musculus* ortólogas ao genoma humano, cujas duplicações e/ou deleções tinham sido associadas à formação de tumores.

Entre as sequências identificadas, foram selecionados quatro segmentos genômicos com *loci* em cromossomos distintos do cariótipo de *Mus musculus*. Os

quatro clones, identificados como 243O4, 313M8, 433H2 e 77N6, possuem *loci* respectivamente nos cromossomos X, 10, 5 e 16.

O clone 433H2 tem localização citogenética em 5A3 (posição genômica 23612965→23801437 pb) e inclui o marcador ortólogo D5Mit179, ligado aos genes *Dmtf1* e *hDMP1* humanos, localizados em 7q11 e 7q36 respectivamente. Alterações envolvendo este marcador são frequentemente encontradas em leucemia mielóide (INOUE *et al.*, 2007; PISKOROWSKA *et al.*, 2011; ENSEMBL, 2012a). Já o clone 313M, tem localização citogenética em 10D1 (posição genômica 103861302→104064817 pb) e contém o marcador D16Mit134, cujas alterações são associadas à formação de linfomas (MORI *et al.*, 2000; ENSEMBL, 2012b).

O clone 77N6 tem localização em 16A2 (15822092→16058501 pb no genoma), contém o marcador ortólogo D16Mit34, com localização em 8q11 e 22q11 no cariótipo humano, e também é associado à formação de linfomas (PISKOROWSKA *et al.*, 2011; ENSEMBL, 2012c). Adicionalmente, para monitoramento do par cromossômico sexual, foi incluído também o clone 243O4, com localização citogenética em XA1.1 (posição genômica 9435252→9487771 pb, ENSEMBL, 2012d).

Estes clones foram disponibilizados sob a forma de cromossomos artificiais bacterianos (pBACe3.6, *bacterial artificial chromosome* – BAC) inseridos em cepas DH10B transformadas de *Escherichia coli* congeladas em meio de cultivo Luria-Bertani (LB). Após o recebimento, os clones foram mantidos a -80° C em ultrafreezer, até o momento da produção das sondas.

A produção das sondas consistiu no isolamento a partir de cada clone, de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio seletivo sólido; do cultivo destas em meio líquido; da extração e purificação do DNA plasmidial; do tratamento deste para a obtenção de fragmentos de tamanhos adequados ao uso como sonda de hibridação; e da marcação do conjunto de fragmentos obtidos de cada clone.

5.5.3.1 Isolamento de UFC e cultivo dos clones

Os clones armazenados a -80° C foram manipulados em condições assépticas e utilizando materiais estéreis. Foram realizados os seguintes procedimentos: remoção de alíquota de 10 µL do estoque congelado; diluição em 100 µL de meio de cultivo LB (triptona 10 g×L⁻¹, extrato de levedura 5 g×L⁻¹, cloreto de sódio 10 g×L⁻¹); plaqueamento em estrias em meio seletivo (LB suplementado

com cloranfenicol 25 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, LB/C) sólido (água a 2%, P:V); incubação a 37 °C por 12 h; isolamento de colônia individual e inoculação desta em 5 mL de meio LB/C em tubo cônico de 50 mL; incubação a 37° C por 8 h em agitação (Termo Shaker®, Fanem); transferência para Erlenmeyer e adição de 45 mL de meio LB/C; incubação a 37° C por 12 h em agitação em (Termo Shaker®, Fanem); amostragem para aferição de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare); separação de cinco alíquotas de 800 μL (quando absorbância $\cong 1$) em criotubos, para composição de estoque de inóculos; adição de 200 μL de glicerol a cada criotubo; homogeneização, identificação (nome do clone e data do procedimento) e armazenamento em ultrafreezer a -80 °C. O volume restante foi utilizado para extração e purificação do DNA.

5.5.3.2 Extração e purificação de DNA

A extração e purificação dos BACs foram realizadas por meio do kit Invisorb Plasmid Midi Kit® (Invitex), como descritas a seguir: transferência do cultivo bacteriano para tubos cônicos de 50 mL; centrifugação a 2.938 \times g (3.800 rpm em centrífuga refrigerada 280R®, Fanem) por 1 h; descarte do sobrenadante e suspensão do *pellet* em 4 mL da “solução I” por agitação (agitador de tubos tipo “vortex” QL-901®, Biomixer); adição de 50 μL de solução de RNase (diluída em 1 mL de “solução I”); adição de 8 mL da “solução II” e homogeneização suave por inversão (5 \times); incubação à temperatura ambiente por 5 min; adição de 8 mL da “solução II” e homogeneização por agitação suave por inversão (6 \times); incubação em gelo por 5 min; centrifugação a 2.938 \times g por 10 min; filtragem em filtro de seringa que compõe no kit; adição de 8 mL da “solução de ligação PL” ao filtrado e homogeneização por inversão (2 \times); transferência da solução para um filtro do tipo “spin” acondicionado em novo tubo cônico de 50 mL e centrifugação a 2.938 \times g por 10 min (repetição da filtragem de todo o volume obtido ao final da etapa anterior); descarte do filtrado; adição de 10 mL da solução “tampão de lavagem PL” ao filtro e centrifugação a 2.938 \times g por 10 min; descarte do filtrado nova centrifugação a 2.938 \times g, por 20 min; acondicionamento do filtro em novo tubo cônico de 50 mL e adição de 600 μL de solução “tampão de eluição” no centro da superfície superior do filtro; incubação à temperatura ambiente por 10 min; centrifugação a 2.938 \times g por 5 min; e transferência do filtrado para microtubo de 1,5 mL.

Após extração e purificação, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare), utilizando comprimentos de onda de 230-302 nm e avaliados quanto à integridade por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TE 1× (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; tris = trisaminometano; EDTA = etilenodiamino tetra-acético) a 100 mV por 1 h.

5.5.3.3. Fragmentação e precipitação de DNA

A fragmentação do DNA foi realizada por meio da incubação com DNase I (RQ1 Rnase-Free DNase®, Promega), por meio da adição, em um microtubo acondicionado em gelo, para cada clone, de 1 µg de DNA, 2,5 µL de tampão *Nick* 10× (tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5), 5 µL de DNase I em tampão *Nick* 1×, volume de água ultrapura para completar 25 µL; após, os microtubos foram incubados a 37° C em termociclador (TC-412®, Techne) por 10 min. Ao final da incubação, foi adicionado 1 µL da solução de bloqueio (ácido etileno glicol tetra-acético 20 mM) a cada microtubo.

Foram testadas cinco concentrações de DNase I: 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} e 2×10^{-6} U×µL⁻¹. Após, os produtos das reações foram avaliados em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1× (tris 40 mM, EDTA 1 mM e ácido acético glacial 0,1%, V:V), submetido a 100 mV por 1 h e corado com EtBr a 0,5 µg×mL⁻¹.

Para a marcação do DNA, cada alíquota foi precipitada por meio dos seguintes procedimentos: adição de 0,1× o volume da solução, de NaAc 3M, pH 5,2 e 2× o volume de etanol absoluto; mistura por inversão e incubação em gelo por 15 min; centrifugação a 20.000×g a 4° C (centrífuga refrigerada Mikro 22R®, Hettich) por 15 min; descarte do sobrenadante, seguido de lavagem do precipitado com etanol 70% gelado e centrifugação a 16.000×g por 10 min (2×); descarte do sobrenadante e secagem do material a 42° C; eluição do DNA em água ultrapura.

5.5.3.4 Marcação dos conjuntos de fragmentos de DNA

O DNA fragmentado pelo tratamento com DNase I foi marcado por meio da utilização dos kits FISHBright® (Kreatech) 495 *Green* e 550 *Red/Orange*, por meio dos seguintes procedimentos: suspensão de 1 µg de DNA em 16 µL de água ultrapura; adição de 2 µL de *ULS hapten/dye*, 2 µL de 10× *labeling solution* e homogeneização; incubação a 85° C por 30 min em termociclador; e incubação no gelo até a purificação.

A purificação foi realizada por meio da utilização de colunas de purificação KREApure® (Kreatech), que foram preparadas para recebimento da solução de marcação por meio da suspensão da solução na coluna por agitação; remoção do lacre plástico e acondicionamento da coluna em microtubo de 2 mL; centrifugação a 20.800×g por 1 min; descarte do filtrado e adição de 300 µL de água ultrapura à coluna; centrifugação a 20.800×g por 1 min; descarte do filtrado e do microtubo; acondicionamento da coluna em microtubo de 1,5 mL.

Após o preparo da coluna, foi aplicada a solução com DNA marcado e realizada centrifugação a 20.800×g por 1 min. O filtrado foi armazenado a -20° C até o preparo do *mix* de hibridação. Todos os procedimentos seguintes com o *mix* foram realizados ao abrigo da luz.

5.5.3.5 Hibridação fluorescente *in situ*

As células obtidas após a aplicação de tripsina nos frascos de cultivo foram suspensas em 10 mL de solução de KCl 75 mM a 37° C e incubadas a 37° C por 10 min. Após, foram adicionadas 5 gotas de fixador Carnoy gelado e a suspensão foi centrifugada a 400×g por 10 min; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* a em 10 mL de fixador Carnoy gelado e incubado à temperatura ambiente por 15 min; procedeu-se a nova centrifugação a 400×g por 10 min e descarte do sobrenadante. O novo *pellet* foi homogeneizado em 500 µL de fixador Carnoy gelado e armazenamento a 4° C, até sua utilização na montagem das lâminas. Esta montagem consistiu na aplicação de 30 µL dessa solução em lâmina de microscopia.

A hibridação das sondas de FISH nestas lâminas, foi realizada nas seguintes etapas: preparo do *mix* de hibridação; pré-tratamento das lâminas; desnaturação; hibridação; lavagem e revelação; e fotodocumentação.

O preparo do *mix* de hibridação (50 µL para cada sonda/clone) consistiu da mistura, em microtubo, de 20 ng de DNA marcado, 500 µg de *Salmon sperm* DNA® (Life Technologies) e 50 µg de *Mouse Cot-1* DNA® (Life Technologies), seguida de homogeneização. Após, a mistura foi precipitada por meio da adição de 0,1× o volume da solução, de NaAc 3M, pH 5,2 e 2× o volume de etanol absoluto. Em seguida, a mistura foi submetida a inversão e incubação em gelo por 15 min; centrifugação a 20.000×g a 4° C (centrífuga Mikro 22R®, Hettich) por 15 min; descarte do sobrenadante seguido de lavagem do precipitado com etanol 70%

gelado e centrifugação a 16.000×g por 10 min (2×); descarte do sobrenadante e secagem do material a 42° C; eluição em tampão de hibridação celular (solução constituinte do kit de marcação FISHBright®, Kreatech).

O pré-tratamento da lâmina consistiu de lavagem em 0,1×SSC (NaCl 15 mM e Na₃C₆H₅O₇ 1,5 mM, pH 7,0) à temperatura ambiente por 1 min, em agitação (VDRL Shaker®, Biomixer); incubação em 2×SSC (NaCl 300 mM e Na₃C₆H₅O₇ 30 mM, pH 7,0) a 75° C por 30 min; resfriamento até \cong 37° C; lavagem em 0,1×SSC à temperatura ambiente por 4 min; e remoção do excedente de líquido da lâmina.

A lâmina foi desnaturada por meio da sua imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 70 mM à temperatura ambiente por 1 min; incubação em 2×SSC a 4° C por 2 min; desidratação em série de etanóis (70%, 85% e 100%) a 4° C por 2 min cada; e secagem à temperatura ambiente. O *mix* de hibridação foi desnaturado por meio da incubação a 75° C por 5 min em termociclador e incubação em gelo até a aplicação na lâmina.

Foram aplicados 10 µL do *mix* de hibridação desnaturado sobre cada lâmina e então cobertos por lamínula. Após, foi realizada a incubação a 37° C por 10 min e a lamínula foi selada com cola vulcanizada. As lâminas foram então incubadas a 37° C em câmara úmida, por 16 h.

A lavagem e revelação das lâminas foi feita por meio da remoção do *rubber cement*; lavagem em IGEPAL CA-630® 0,3% (Octil-fenil-polietilenoglicol, IGEPAL®, Sigma-Aldrich) em 0,4×SSC (tampão citrato trissódico: NaCl 60 mM e Na₃C₆H₅O₇ 9 mM, pH 7,0) a 60° C por 2 min; lavagem em 2×SSC, 0,1% IGEPAL à temperatura ambiente por 30 s; desidratação em série de etanóis (70%, 85% e 100%) a 4° C por 2 min cada; secagem à temperatura ambiente; aplicação de 10 µL ProLong Gold Antifade® (Life Technologies) e cobertura com lamínula. A fotodocumentação foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 com câmera digital DP70 acoplada e *software* DP70-BSW.

5.5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Após remoção das células dos frascos de cultivo, realizada com o auxílio da solução de tripsina como descrito na seção 5.4.1, essas foram suspensas em 1 mL de PBS suplementado com 3% de albumina humana (Albumina Humana Grifols® 20%, PBS/A). A suspensão resultante foi submetida à determinação do número e

proporção de células não viáveis pelo método de coloração com azul de Trypan, como descrito na seção 5.3.3, seguida do ajuste da densidade de células viáveis para 10^6 células/mL.

A avaliação imunofenotípica destas células foi realizada por meio da técnica imunofenotipagem por citometria de fluxo em citômetro FACSCanto II® (BD Biosciences), utilizando os anticorpos monoclonais conjugado com fluorocromos, e seus respectivos controles isotípicos (TABELA 3).

TABELA 3 – RELAÇÃO DE ANTICORPOS, MARCAÇÃO E CONTROLES ISOTÍPICOS UTILIZADOS.

Anticorpo	Marcação (fluorocromo)	Especificação (clone, tipo)	Controle isotípico (clone, tipo)	Marcação (fluorocromo)
anti-CD34	Alexa647	RAM34, IgG _{2a} kappa	R35-95, IgG _{2a} - <i>Rattus</i>	Alexa647
anti-CD45	FITC	30-F11, IgG _{2b} kappa	A95-1, IgG _{2b} kappa- <i>Rattus</i>	FITC
anti-CD73	PE	TY/23, IgG _{2a} kappa	R35-95, IgG _{2a} - <i>Rattus</i>	PE
anti-CD90.1	PE	OX-7, IgG ₁ kappa	R35-95, IgG _{2a} - <i>Rattus</i>	PE
anti-CD105	PE	MJ7/18, IgG _{2a} kappa	R35-95, IgG _{2a} - <i>Rattus</i>	PE

Cada amostra foi analisada por meio da combinação dos anticorpos relacionados na Tabela 3, mais o corante 7AAD (7-Aminoactinomicina D, 7-AAD *Staining Solution*®, BD Biosciences) para a identificação de células não viáveis, distribuídos em quatro tubos distintos, mais um controle negativo contendo apenas células (TABELA 4).

TABELA 4 – COMBINAÇÃO (PAINEL) DE ANTICORPOS PARA ANÁLISE DE CADA AMOSTRA.

Tubos	MARCAÇÃO ("Cores"/fluorocromos)			
	FITC	PE	PerCP	ALEXA647
1 (Controle negativo)	-	-	-	-
2 (Controle isotípico)	A95-1	R35-95	-	R35-95
3	anti-CD45	anti-CD73	7-AAD	anti-CD34
4	anti-CD45	anti-CD90.1	-	anti-CD34
5	anti-CD45	anti-CD105	-	anti-CD34

CTMAs da última passagem de todos os cultivos, homogeneizadas em PBS/A, foram separadas em alíquotas de 100 µL e dispensadas em tubos de 5 mL

para citometria de fluxo. Após, foram adicionados 5 μ L de cada anticorpo aos tubos 2-4, conforme indicado na Tabela 4, e homogeneizados por agitação em agitador tipo vortex. As suspensões foram então incubadas por 15 min à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida foram adicionados 400 μ L de PBS/A em cada tubo, seguida de homogeneização por agitação e centrifugação a 400 \times g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado em 500 μ L de PBS/A.

Ao tubo 3 de cada amostra foram adicionados 5 μ L de 7-AAD momentos antes da aquisição em citômetro. As CTMs foram então adquiridas em citômetro acoplado ao *software* de análise BD FACSDiva II® (BD Biosciences) e posteriormente analisadas por meio do *software* Infinicyt® (Cytognos) para a ligação/marcação de cada anticorpo (expressão do marcador) e 7-AAD (células não viáveis).

5.5.5 Diferenciação celular *in vitro*

CTMAs da última passagem de todas as amostras cultivadas foram submetidas à indução de diferenciação em duas linhagens celulares: adipogênica e osteogênica. Os procedimentos realizados nesta etapa são descritos a seguir.

5.5.5.1 Diferenciação celular adipogênica

Para a indução da diferenciação adipogênica, foram utilizados cultivos de CTMA em placas de 6 poços. Ao atingirem \cong 85% de confluência, três poços tiveram o meio DMEM/SFB suplementado com isobutilmetilxantina 0,5 mM (3-isobutil-1-metilxantina), indometacina 50 μ M e dexametasona 0,5 μ M (Sigma-Aldrich).

O meio de diferenciação adipogênica (DMEM/DIFA) foi preparado por meio da mistura de: 3 mL de solução de IBMX (0,18% em água, P:V); 90 μ L de solução de indometacina 1% em etanol (P:V); 490 μ L de solução de dexametasona (0,1% em etanol, P:V; diluído em DMEM, 1:49, V:V); e 46,42 mL de meio DMEM/SFB. Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana com microporos de 0,22 μ m (membrana de fluoreto de polivinilideno, PVDF, TPP).

As CTMAs foram incubadas com meio DMEM/DIFA a 37° C e 5% CO₂ por 14 dias, com substituição do meio a cada 72 h. O mesmo procedimento foi realizado paralelamente, com os poços de controle negativo, com meio de cultivo DMEM/SFB.

Após o período de diferenciação, as placas foram submetidas à coloração para evidência do acúmulo citoplasmático de gotículas lipídicas (diferenciação em adipócitos), conforme os seguintes procedimentos: remoção do meio de cultivo de todos os poços (diferenciação e controle); enxágue do poço com PBS (2x); fixação das células com solução aquosa de glutaraldeído a 2,5% (P:V, Sigma-Aldrich) por 1 h 30 min; enxágue do poço com água destilada (2x); desidratação com isopropanol 60% (V:V) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte do isopropanol e adição da solução de Oil Red O® (Sigma-Aldrich) (0,3% em isopropanol 99%, P:V, diluídos em água na proporção de 3:2, V:V) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte da solução corante e enxágue com água destilada (2x); fotodocumentação e análise em microscópio invertido.

5.5.5.2 Diferenciação celular osteogênica

A diferenciação osteogênica foi induzida em cultivos de CTMAs em placas de 6 poços exibindo $\cong 85\%$ de confluência. Nestas, três poços tiveram o meio DMEM/SFB suplementado com dexametasona 10 nM, β -glicerolfosfato 10 mM e ascorbato-2-fosfato 50 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich).

O meio de diferenciação osteogênica (DMEM/DIFO) foi preparado por meio da mistura de: 5 mL de solução ascorbato-2-fosfato/ β -glicerolfosfato em meio DMEM/SFB (0,05% de ascorbato-2-fosfato e 2,16% de β -glicerolfosfato em meio DMEM, P:V); 98 μL de solução de dexametasona (0,1% em etanol, P:V, diluído em DMEM, 1:49, V:V); 44,02 mL de meio DMEM/SFB; Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana com microporos de 0,22 μm .

As CTMAs foram incubadas com meio DMEM/DIFO a 37° C e 5% CO₂ por 14 dias, com substituição do meio a cada 72 h. O mesmo procedimento foi realizado paralelamente, com os poços de controle negativo, com meio de cultivo DMEM/SFB.

Após o período de diferenciação, as placas foram submetidas à coloração para evidência da secreção de matriz extracelular mineralizada (diferenciação em osteócitos), conforme os seguintes procedimentos: remoção do meio de cultivo de todos os poços (diferenciação e controle); enxágue do poço com PBS (2x); fixação das células com solução aquosa de glutaraldeído a 2,5% (P:V) por 1 h 30 min; enxágue com água destilada (duas vezes); desidratação com isopropanol 60% (V:V) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte do isopropanol e adição da solução corante de alizarina (1,37% em água ultrapura, P:V, pH 4,1-4,3,

Sigma-Aldrich) e incubação à temperatura ambiente por 45 min; descarte da solução corante e enxágue com PBS (3×); fotodocumentação e análise em microscópio invertido.

5.5.6 Potencial tumorigênico *in vivo*

As CTMAs obtidas na última passagem de cada um dos cultivos foram avaliadas quanto ao potencial tumorigênico *in vivo*, por meio da inoculação subcutânea no dorso de camundongos fêmeas da linhagem NOD.CB17-Prkdc(scid)/J. O putativo potencial tumorigênico foi avaliado por meio de palpação, a cada cinco dias, durante sessenta dias. Ao final do período, foi realizada cirurgia exploratória no local de inoculação para possível identificação e extração de tumor.

5.5.6.1 Inoculação

Quando os frascos de cultivo da última passagem de cada amostra atingiram $\cong 85\%$ de confluência, procedeu-se à remoção e descarte do meio de cultivo, seguida da adição de PBS/PE a 37° C e agitação suave e descarte do PBS/PE (3×). Adicionou-se 1 mL de solução de tripsina 0,25% a 37° C e o frasco foi incubado por 5 min a 37° C e 5% de CO₂; realizou-se a avaliação visual da morfologia das células em microscópio invertido, para certificação da perda da adesão celular ao frasco e após, foi realizada inibição da ação enzimática pela adição de meio DMEM/SFB na proporção 1:1 (V:V); a suspensão celular foi transferida para tubo cônico de 10 mL e centrifugada a 400×g por 10 min. As CTMAs foram então solubilizadas em PBS estéril a 37° C, compondo alíquotas com 5×10^5 células acondicionadas em 300 μ L de PBS.

Uma alíquota de cada amostra foi utilizada como inóculo em animais da linhagem NOD.CB17-Prkdc(scid)/J para avaliação de potencial tumorigênico dos cultivos de CTMAs, tendo sido utilizado um animal por alíquota. Os animais foram inicialmente anestesiados, como descrito no item 5.3.1, e após, receberam injeção subcutânea dos inóculos na região dorso-lateral direita.

5.5.6.2 Avaliação da formação de tumores

Cinco dias após a inoculação, os animais passaram a ser manipulados para palpação do local de injeção do inóculo e avaliação do possível crescimento celular

local. Este procedimento foi repetido a cada cinco dias, até se completarem sessenta dias de avaliação, exceto para os animais que receberam inóculos das amostras A2 e A3, os quais foram submetidos à eutanásia, respectivamente, aos 50 e 30 dias após a inoculação.

Ao final do período de avaliação *in vivo*, os animais foram submetidos à anestesia e posterior eutanásia, conforme descrito nos itens 5.3.1 e 5.3.2. Após a eutanásia, procedeu-se à cirurgia exploratória no local de injeção do inóculo, para identificação visual e remoção de possível massa celular resultante da proliferação das CTMAs inoculadas. Os tumores identificados foram removidos e processados conforme descrito no item 5.5.7.

5.5.6.3 Análise histopatológica dos tumores

Os tumores removidos foram acondicionados em tubo cônico de 50 mL previamente pesado, contendo 50 mL de PBS/PE a 37° C. Após, foi realizada nova pesagem dos tubos para determinação da massa de tumor recuperada.

Após, os tumores foram manipulados em câmara de fluxo laminar, procedendo-se à lavagem dos mesmos com PBS/PE a 37° C em tubos cônicos de 50 mL, seguida por fragmentação com bisturi em placa de Petri.

Parte dos fragmentos foi acondicionada em solução aquosa de paraformaldeído a 4% (V:V) e armazenados a 4° C, para posterior análise histopatológica. Esta foi gentilmente realizada pela médica patologista M. Sc. Lismary Aparecida de Forville Mesquita.

6 RESULTADOS

6.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CTM DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL DE *Mus musculus* LINHAGEM SWISS

6.1.1 Obtenção de tecido adiposo epididimal e rendimento celular

Os dez animais submetidos à eutanásia para obtenção cirúrgica de tecido adiposo epididimal (FIGURA 2) originaram dez amostras de CTMA, identificadas de A1 a A10. Os animais apresentavam idade de $99,70 \pm 3,26$ dias e massa corporal de $39,09 \pm 7,62$ g. Foram extraídos, em média, 568 ± 246 mg de tecido adiposo, correspondentes a $1,42\% \pm 0,60\%$ da massa corporal de cada animal (detalhamento no ANEXO 3).

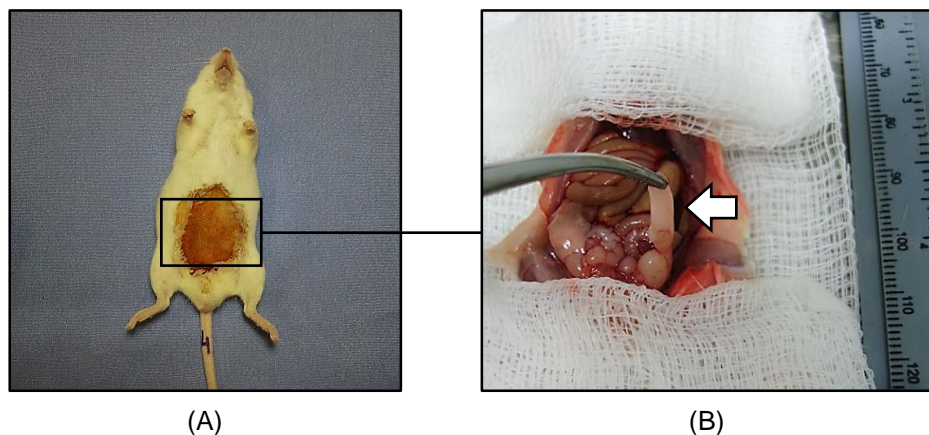


FIGURA 2 – EXEMPLAR MACHO DE *Mus musculus* LINHAGEM SWISS. (A) ANIMAL EM DECÚBITO DORSAL, PREPARADO PARA LAPAROTOMIA. (B) DETALHE DA CAVIDADE ABDOMINAL COM DESTAQUE AO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL (SETA).
FONTE: O autor (2013).

As células isoladas do tecido adiposo epididimal apresentaram viabilidade média, avaliada por meio da coloração por azul de Trypan e contagem em hemocítômetro, de $78,95\% \pm 26,05\%$; o rendimento mínimo e máximo foi de $2,22 \times 10^5$ e $2,18 \times 10^7$ células, respectivamente ($\bar{x} = 6,44 \times 10^6 \pm 7,44 \times 10^6$).

6.1.2 Cultivos celulares e passagens

Foram estabelecidos dez cultivos, um a partir de cada amostra de tecido adiposo epididimal/animal. Os cultivos tiveram duração média de $116,45 \pm 16,97$ dias e atingiram as passagens selecionadas para análise, P3, P9 e P15, respectivamente em $10,30 \pm 1,63$, $72,10 \pm 14,79$ e $110,60 \pm 14,74$ dias, contados a partir do isolamento e primeira inoculação nos frascos de cultivo (GRÁFICO 1).

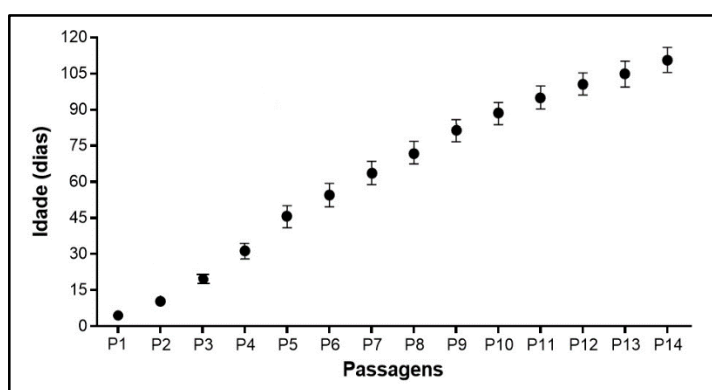


GRÁFICO 1 – IDADE DOS CULTIVOS DE CTMA, EM DIAS, AO TÉRMINO DE CADA PASSAGEM (P1-P14).

FONTE: O autor (2013).

As células obtidas após a confluência de $\cong 85\%$ da superfície de crescimento do frasco, a partir de P1 de cada cultivo, foram utilizadas como inóculos para as passagens seguintes. Os inóculos apresentaram viabilidade média mínima de $88,98\% \pm 12,39\%$ (em P7) e máxima de $98,18\% \pm 1,21\%$ (em P15). Os valores médios de viabilidade não apresentaram diferença estatisticamente significativa de P2 a P15 (GRÁFICO 2). Foi observada diferença significativa entre as médias de viabilidade entre o primeiro inóculo (P1), resultante do isolamento a partir do tecido adiposo, e os inóculos de P2, P3, P5, P10, P11, P12, P13, P14 e P15.

O tempo decorrido entre a inoculação e a realização da passagem exibiu variação tanto entre amostras quanto entre passagens, com diferença estatisticamente significativa envolvendo preferencialmente as passagens P1, P2, P4, P5. Foi observado aumento no tempo de duração entre as passagens P2

($5,80 \pm 1,22$ dias) e P5 ($13,70 \pm 5,61$ dias) e redução entre P5 e P14. Não foi observada diferença significativa entre as passagens P6 à P14 (GRÁFICO 3).

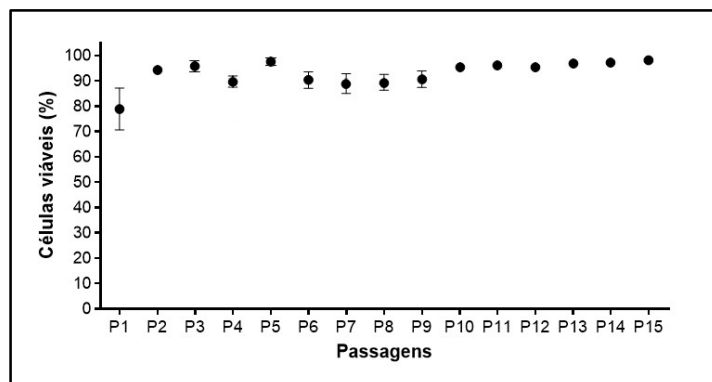


GRÁFICO 2 – VIABILIDADE DOS INÓCULOS DE CADA PASSAGEM.
FONTE: O autor (2013).

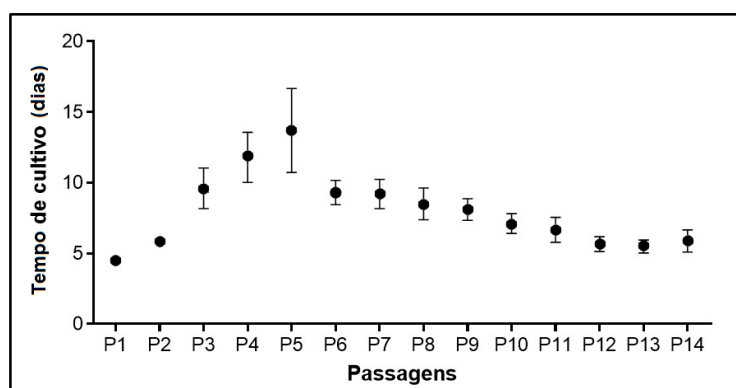


GRÁFICO 3 – TEMPO DE CULTIVO EM CADA PASSAGEM.
FONTE: O autor (2013).

As amostras A2 e A3 exibiram perfil morfológico (FIGURA 3) e de proliferação celular sensivelmente distintos das demais após P9. O cultivo dessas amostras foi interrompido em P13 e P10, respectivamente. Após a interrupção desses cultivos, foi obtida uma amostra criopreservada de células do carcinoma mamário de Erlich. Estas foram cultivadas sob as mesmas condições das amostras de CTMAs e utilizadas como controle positivo tumoral quanto ao perfil de crescimento populacional, imunofenotípico e de tumorigênese *in vivo*.

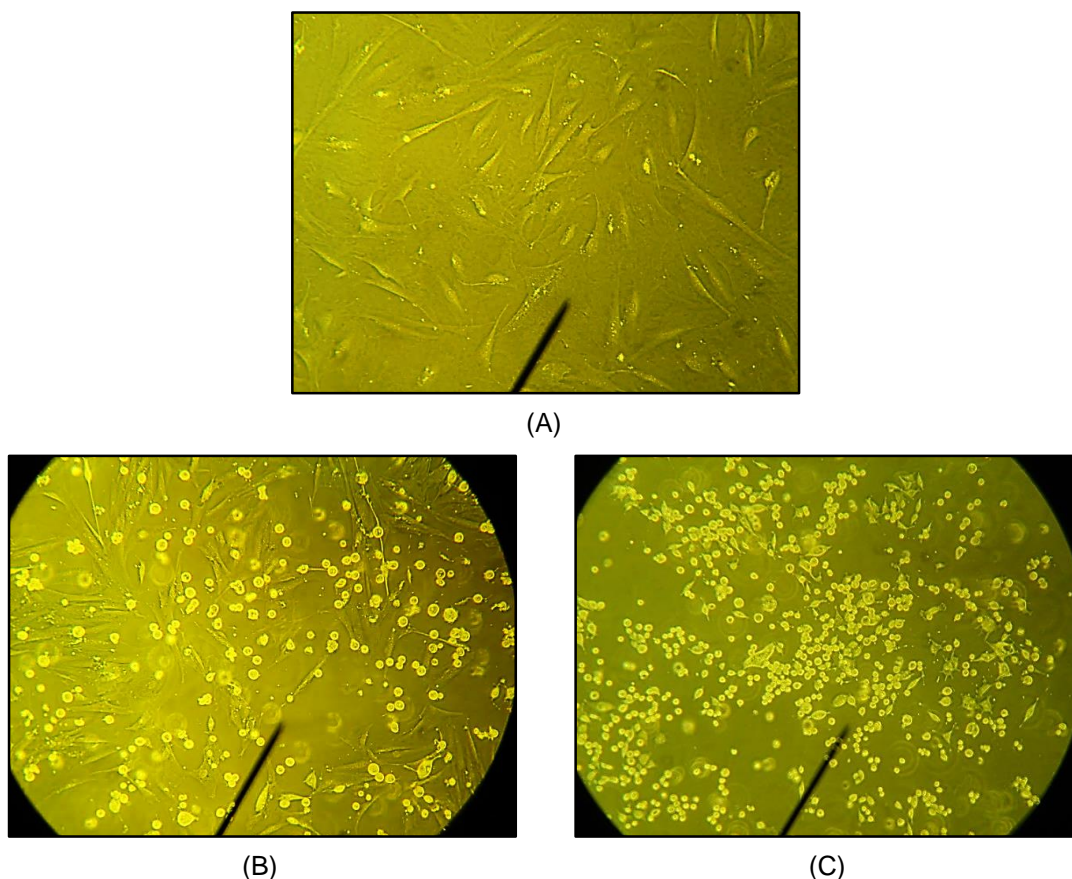


FIGURA 3 – CULTIVOS DE CTMA. (A) AMOSTRA A1 EM P15 EXIBINDO CÉLULAS ADERENTES COM ASPECTO FIBROBLASTÓIDE, SIMILAR ÀS AMOSTRAS A4 A A10 NA MESMA PASSAGEM. (B) AMOSTRA A2 EM P13 EXIBINDO PROPORÇÃO EQUIVALENTE DE CÉLULAS ADERENTES E EM SUSPENSÃO. (C) AMOSTRA A3 EM P10 APRESENTANDO PREDOMÍNIO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.

FONTE: O autor (2013).

6.1.3 Cinética do crescimento populacional

As seis amostras analisadas diariamente durante quinze dias, três em P3 (A2, A3 e A10) e três em P15 (A4, A5 e A6), exibiram redução do tempo de proliferação entre P3 e P15 e deslocamento do período de crescimento exponencial para os primeiros dias do cultivo (GRÁFICO 4). Em P3, o crescimento exponencial foi identificado entre o décimo segundo e décimo quinto dia de cultivo, com tempo médio de duplicação de 28 h 16 min; já em P15, o crescimento exponencial foi observado entre o terceiro e o sexto dia do cultivo, com tempo médio de duplicação de 20 h 24 min.

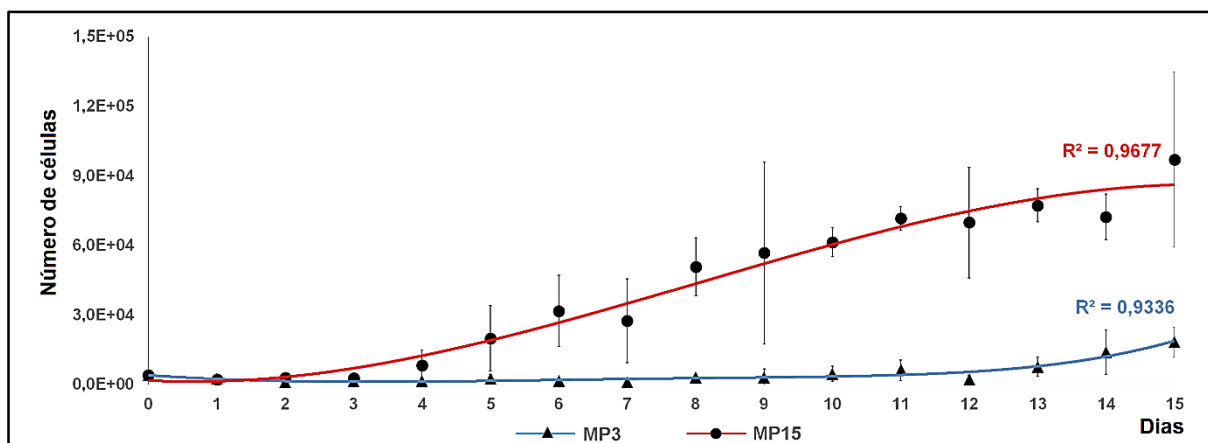


GRÁFICO 4 – CRESCIMENTO POPULACIONAL MÉDIO DE TRÊS AMOSTRAS DE CTMA EM P3 (MP3) E P15 (MP15) DURANTE QUINZE DIAS.

FONTE: O autor (2013).

Quando submetida à avaliação cinética, a amostra A2 em P13 exibiu crescimento exponencial do segundo ao oitavo dia de cultivo, com tempo de duplicação de 28 h 47 min. A amostra A3 em P10 exibiu crescimento exponencial no mesmo período, com tempo de duplicação de 19 h 55 min. Também a amostra de células tumorais do carcinoma mamário de Ehrlich exibiu crescimento exponencial do segundo ao oitavo dia do cultivo, com tempo de duplicação de 17 h 34 min (GRÁFICO 5).

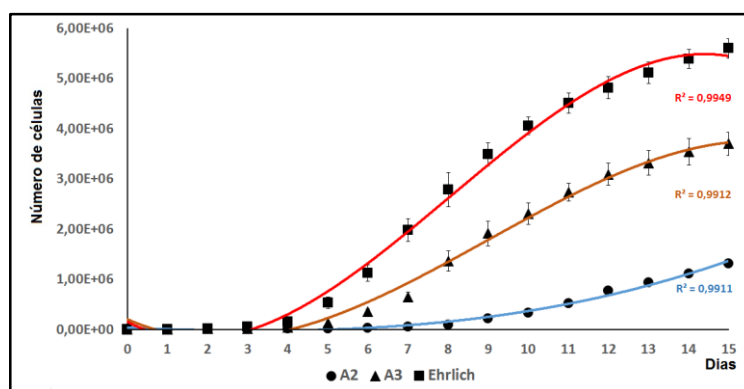


GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO POPULACIONAL DAS AMOSTRAS A2 E A3, RESPECTIVAMENTE EM P13 E P10; E DE AMOSTRA DO CARCINOMA MAMÁRIO DE EHRlich.

FONTE: O autor (2013).

6.2 ALGORITMO DE ANÁLISE

As análises realizadas no presente estudo foram delineadas com o intuito de avaliar a exequibilidade e sensibilidade do algoritmo proposto por Irioda *et al.* (2011) para a avaliação de CTM cultivadas (FIGURA 4).

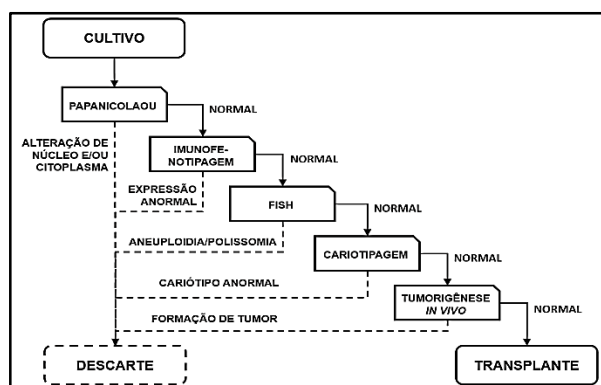


FIGURA 4 – ALGORITMO DE AVALIAÇÃO DE CTM.

FONTE: adaptado de Irioda *et al.* (2011).

A sequência na qual os testes foram aplicados às amostras teve variação daquele originalmente proposto no algoritmo, em razão da otimização de recursos e redução do número de animais necessários, atendendo aos preceitos atuais de experimentação pré-clínica (ECKELMAN *et al.*, 2007; DE VRIES *et al.*, 2012).

As técnicas de Papanicolaou, cariotipagem e FISH foram aplicadas às amostras nas três passagens selecionadas; enquanto os testes de imunofenotipagem por citometria de fluxo e tumorigênese *in vivo*, apenas em P15. Adicionalmente, também em P15, foi realizado o teste de diferenciação adipogênico e osteogênico.

Exceções foram feitas às amostras A2 e A3, em consequência de seus cultivos terem sido interrompidos. A imunofenotipagem por citometria de fluxo e tumorigênese *in vivo* foram realizadas nas passagens nas quais os cultivos foram interrompidos. O mesmo ocorreu com o teste de diferenciação para a amostra A2. A amostra A3 não foi submetida ao teste de diferenciação em razão de as suas células apresentarem proliferação em suspensão, sem aderência ao frasco de cultivo.

6.2.1 Papanicolaou

Foram avaliadas todas as amostras em P3 e P9; e oito amostras (A1 e A4-A10) em P15. Para cada amostra e passagem, foram analisadas mais de 4.000 células, tendo sido estabelecido o número mínimo de 200 células por amostra e passagem (ANEXO 4).

Foram identificadas células com número alterado de núcleos (FIGURA 5) e/ou morfologia nuclear atípica (FIGURA 6) em todas as amostras e passagens avaliadas. A menor frequência de alterações detectada foi igual $0,20\% \pm 0,28\%$ das células, na amostra A7 em P3; e a máxima igual a $6,78\% \pm 3,91\%$, na amostra A3 em P9 (GRÁFICO 6).

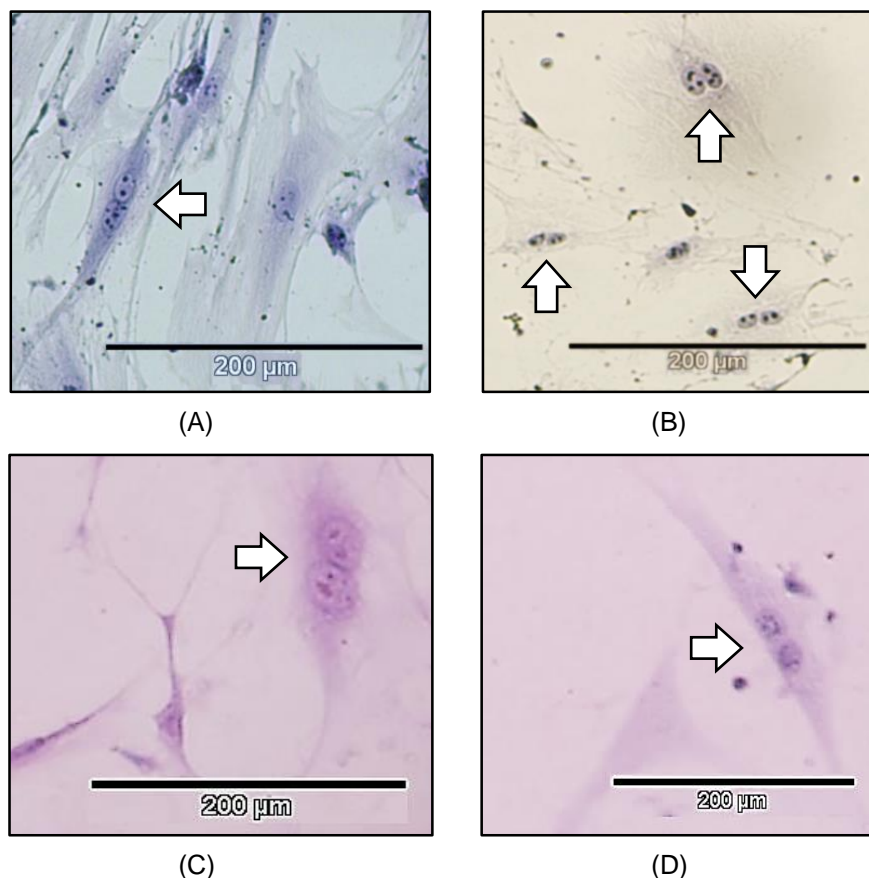


FIGURA 5 – CÉLULAS DE QUATRO AMOSTRAS, EXIBINDO BINUCLEAÇÃO (SETAS). (A) A4 EM P3; (B) A3 EM P3; (C) A6 EM P15; E (D) A1 EM P15.

FONTE: O autor (2013).

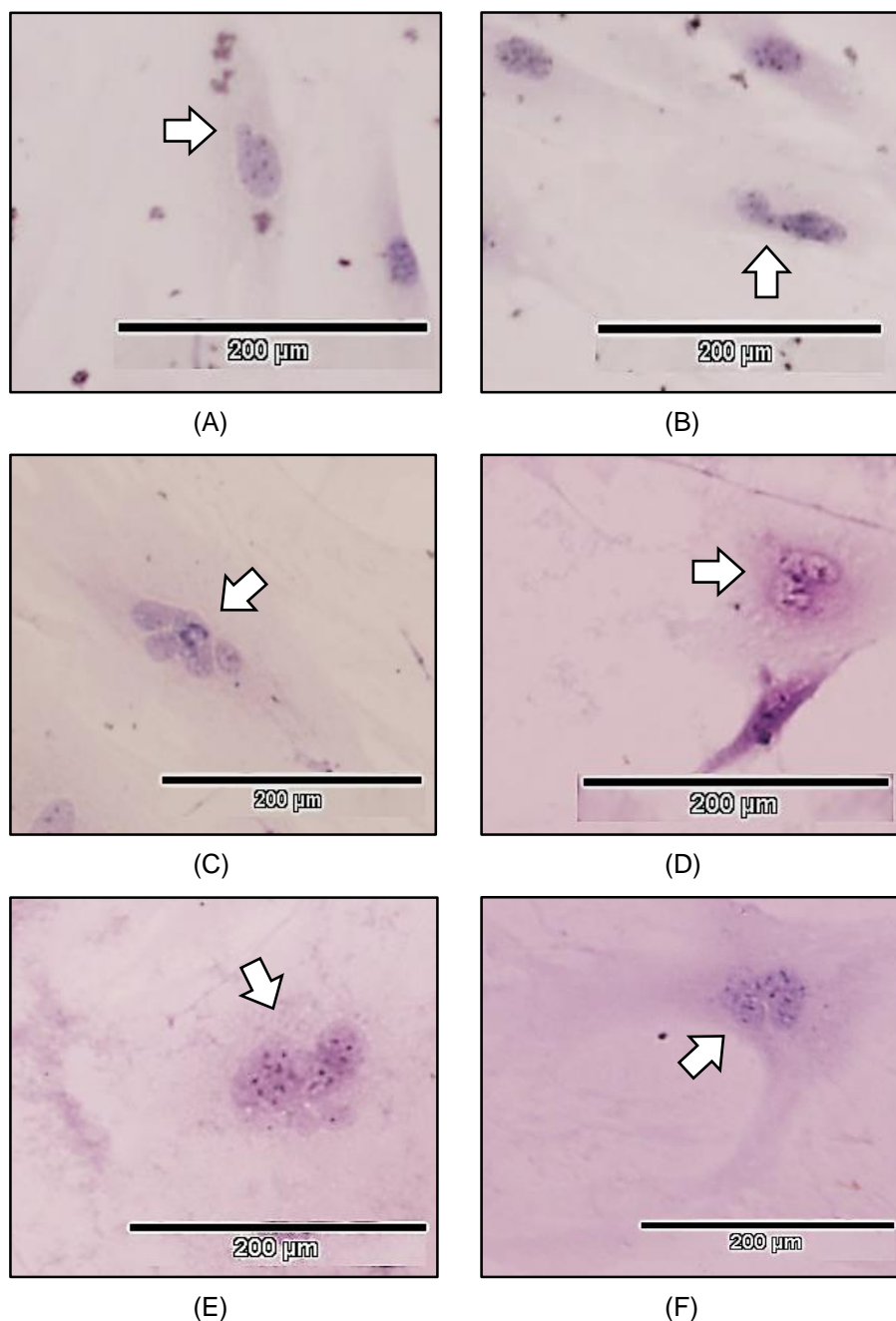


FIGURA 6 – CÉLULAS EM P15, EXIBINDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE NÚCLEOS (SETAS). (A, B) AMOSTRA A8; (C) A9; (D) A4; (E) A5; E (F) A1.
 FONTE: O autor (2013).

Com base no sistema Bethesda de classificação (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; APGAR *et al.*, 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013), as alterações nucleares morfológicas identificadas correspondem à células escamosas atípicas de significado indeterminado (*atypical squamous cells of undetermined significance*, ASC-US, FIGURA 6, A e B) e células escamosas atípicas não

excludentes de lesões intra-epiteliais de alto grau (*atypical squamous cells - cannot exclude high grade intraepithelial lesion - HSIL*, ASC-H, FIGURA 6, C-F). Já a multinucleação (FIGURA 5) é característico de células de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (*low grade squamos intraepithelial lesion*, LSIL).

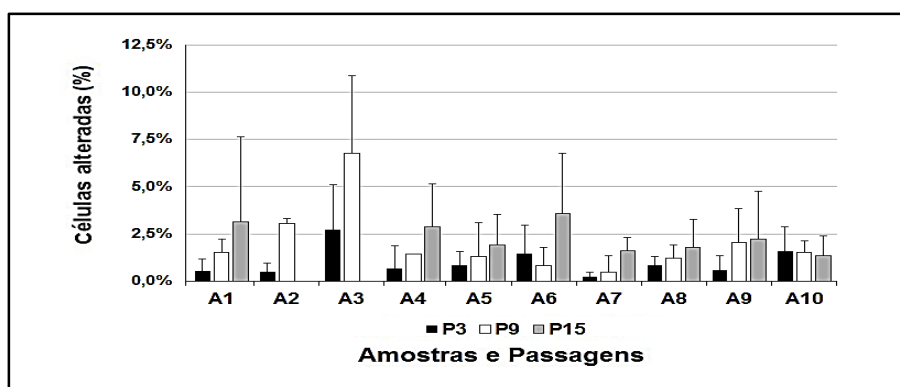


GRÁFICO 6 – PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM MORFOLOGIA NUCLEAR ATÍPICA E/OU NÚMERO ALTERADO DE NÚCLEOS, POR AMOSTRA E PASSAGEM.

FONTE: O autor (2013).

Em média, foram detectadas alterações em $0,98\% \pm 0,74\%$ das células em P3, $2,01\% \pm 1,82\%$ em P9 e $2,52\% \pm 0,74\%$ em P15. Ao se isolar as amostras com perfis proliferativos atípicos (A2 e A3) da análise, os valores das frequências de alterações das demais amostras exibem diferença estatisticamente significativa entre as passagens P3 e P9 em relação à P15 ($p < 0,01$, GRÁFICO 7A).

Considerando todas as amostras avaliadas, os valores crescentes identificados entre as passagens não exibiram diferença significativa (GRÁFICO 7B). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao tipo de alteração (morfológica ou numérica) entre as amostras e passagens.

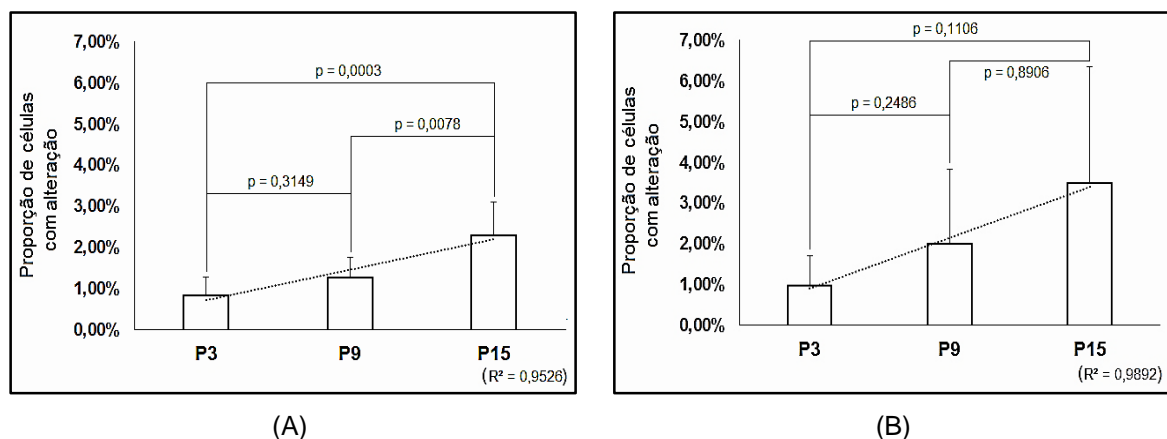


GRÁFICO 7 – PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM MORFOLOGIA NUCLEAR ATÍPICA E/OU NÚMERO ALTERADO DE NÚCLEOS, POR PASSAGEM DO CULTIVO (ANOVA E TESTE DE TUKEY). (A) MÉDIA DAS AMOSTRAS EXCETO A2 E A3. (B) MÉDIA ENTRE TODAS AS AMOSTRAS UTILIZANDO ESTIMATIVAS DOS VALORES CORRESPONDENTES DE A2 E A3 EM P15.

FONTE: O autor (2014).

Das amostras com perfil morfológico e de proliferação atípicos, a amostra A2 exibiu frequência de alteração igual a $0,47\% \pm 0,39\%$ em P3 e $3,06\% \pm 0,24\%$ em P9. A frequência de alterações em P3 exibiu diferença significativa em relação ao identificado na amostra A3 ($p = 0,0146$), mas não em relação à média das demais amostras ($0,93\% \pm 1,08\%$, $p = 0,9636$). Em P9, a frequência observada não se mostrou significativa em relação à amostra A3 ($p = 0,3045$) ou em relação às demais amostras ($p = 0,8740$).

A amostra A3 exibiu a maior proporção de células alteradas, tanto em P3 quanto em P9, com valores iguais a $2,71\% \pm 2,39\%$ e $6,78\% \pm 3,91\%$, respectivamente. A frequência observada em P3 não exibiu diferença significativa da média das demais amostras ($0,93\% \pm 1,08\%$, $p = 0,0849$), diferentemente da frequência identificada em P9 (demais amostras = $1,23\% \pm 1,22\%$, $p = 0,0391$).

Foram estimados os valores correspondentes às frequências das alterações que possivelmente seriam detectadas nas amostras A2 e A3 em P15 por meio de regressão linear, utilizando-se as equações indicadas no Gráfico 8.

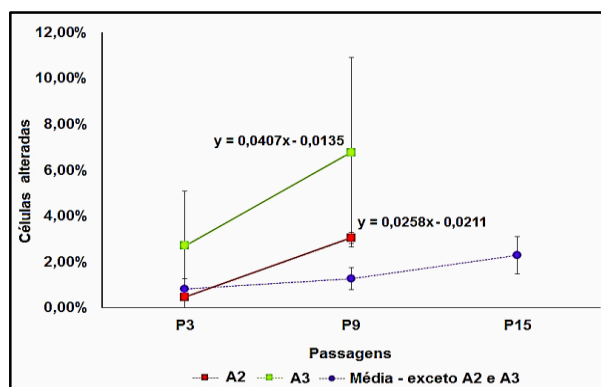


GRÁFICO 8 – REGRESSÃO LINEAR DA PROPORÇÃO MÉDIA DE CÉLULAS COM ALTERAÇÃO, DETECTADA POR MEIO DA TÉCNICA DE PAPANICOLAOU, PARA AS AMOSTRAS A2 E A3.

FONTE: O autor (2014).

Os valores determinados foram iguais a 5,63% e 10,86%, respectivamente para as amostras A2 e A3. O valor calculado para a amostra A3 apresenta diferença estatisticamente significativa da média das demais amostras ($2,33\% \pm 0,80\%$, $p=0,0001$) e do valor estimado para A2 ($p=0,0061$), enquanto este não exibe diferença significativa da média das demais amostras ($2,33\% \pm 0,80\%$, $p=0,0505$).

Mesmo tendo sido identificadas alterações em todas as amostras e passagens, a proporção de células alteradas na amostra A3 em P3 e P9, bem como o aumento expressivo na frequência de alterações na amostra A2 entre P3 e P9 ($\cong 6,5\times$), destacaram-nas das demais, corroborando a hipótese de transformação.

6.2.2 Citogenética: Cariotipagem por bandamento G

Foram identificadas alterações cromossômicas numéricas em todas as amostras, nas três passagens selecionadas para análise. Em P3, $22,66\% \pm 15,23\%$ das metáfases analisadas exibiram cariótipo numericamente anormal, enquanto em P9 e P15 estas corresponderam a $90,37\% \pm 17,69\%$ e $94,05\% \pm 9,78\%$, respectivamente (GRÁFICO 9).

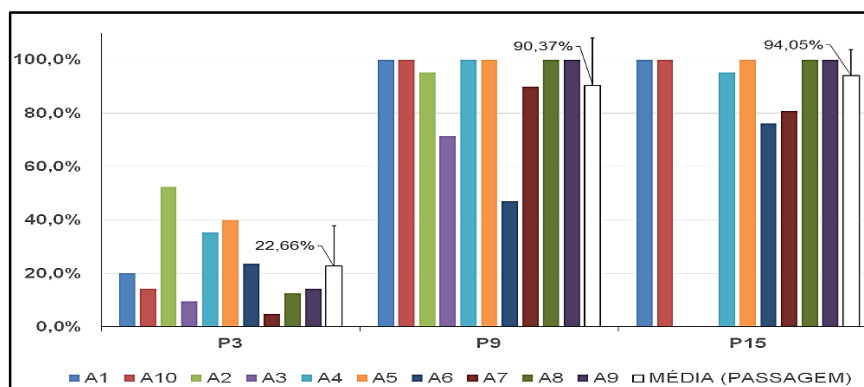


GRÁFICO 9 – PROPORÇÃO DE CARIÓTIPO ANORMAL, POR AMOSTRA E PASSAGEM DO CULTIVO.

FONTE: O autor (2013).

A menor proporção de metáfases com alteração do número de cromossomos foi identificada na amostra A7 em P3, com cariótipo 40,XY[20]/80,XXYY[1]. A maior proporção, que compreendeu a totalidade das metáfases com alteração cromossômica numérica, foi identificada nas amostras A1, A8, A9 e A10 em P9 e P15; e na amostra A5 em P15.

A manutenção do cariótipo normal (FIGURA 7) apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os períodos de análise P3 e P9, P3 e P15, e não diferiu entre P9 e P15 (GRÁFICO 10).

Foi observada grande variação do número de cromossomos por metáfase entre as amostras e passagens (detalhamento no ANEXO 5), apresentando diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as passagens P3 e P9 e também entre P3 e P15, não diferindo entre P9 e P15 ($p = 1,0$, GRÁFICO 11).

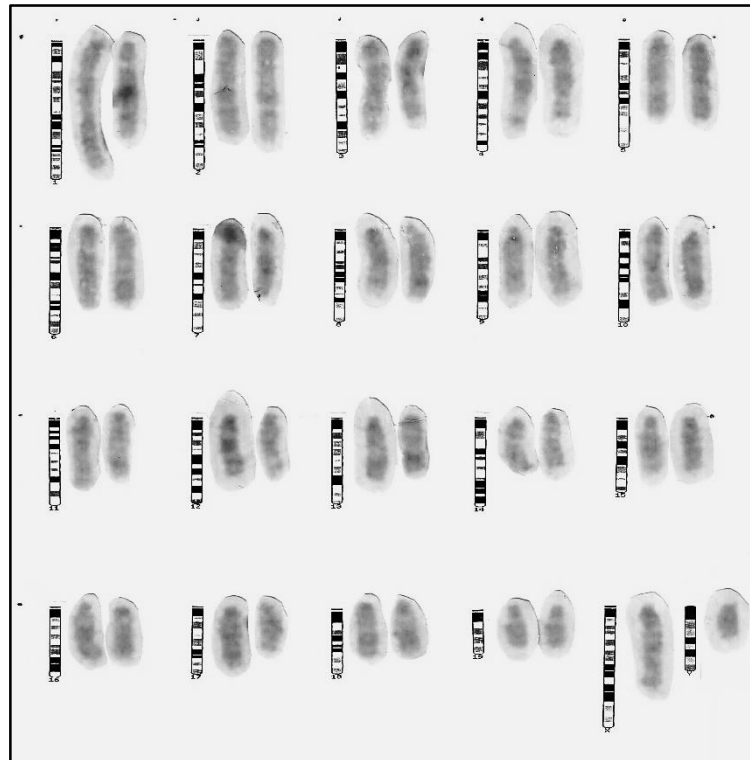


FIGURA 7 – CARIÓTIPO NORMAL, 40,XY DE *Mus musculus*.
FONTE: O autor (2013).

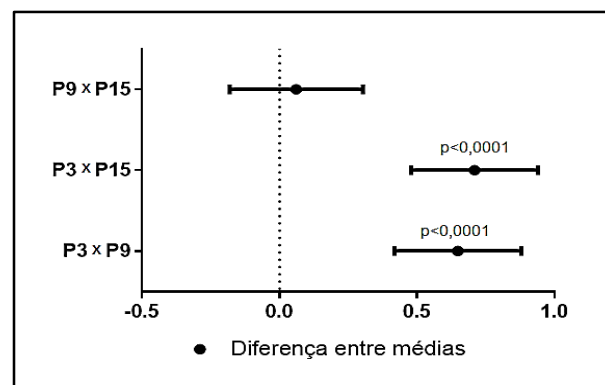


GRÁFICO 10 – DIFERENÇA ENTRE AS
FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS
COM CARIÓTIPO NORMAL, POR
PASSAGEM (ANOVA E TESTE
DE TUKEY).

FONTE: O autor (2013).

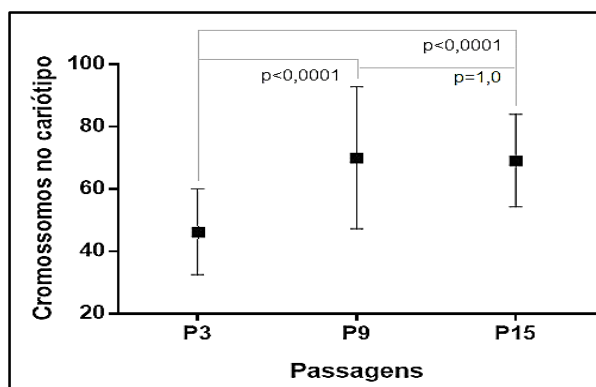


GRÁFICO 11 – NÚMERO MÉDIO DE CROMOSSOMOS POR METÁFASE, POR PASSAGEM DO CULTIVO (ANOVA E TESTE DE TUKEY).

FONTE: O autor (2013).

Foram identificadas alterações cromossômicas estruturais apenas em P9 e P15. Em P9, estas foram detectadas em seis amostras (A1, A2, A3, A7, A8 e A9) e em P15, em oito amostras (A1, A4-A10). Todas essas alterações foram identificadas como amplificações extracromossômicas e foram detectadas em diferentes quantidades por metáfase e amostra (FIGURA 8, detalhamento no ANEXO 5).

Em P9 foram identificadas amplificações em 17,14% das metáfases, variando em número de um a cinco por metáfase. Em P15, foram identificadas em 23,80% das metáfases, com variação de um a seis (GRÁFICO 12).

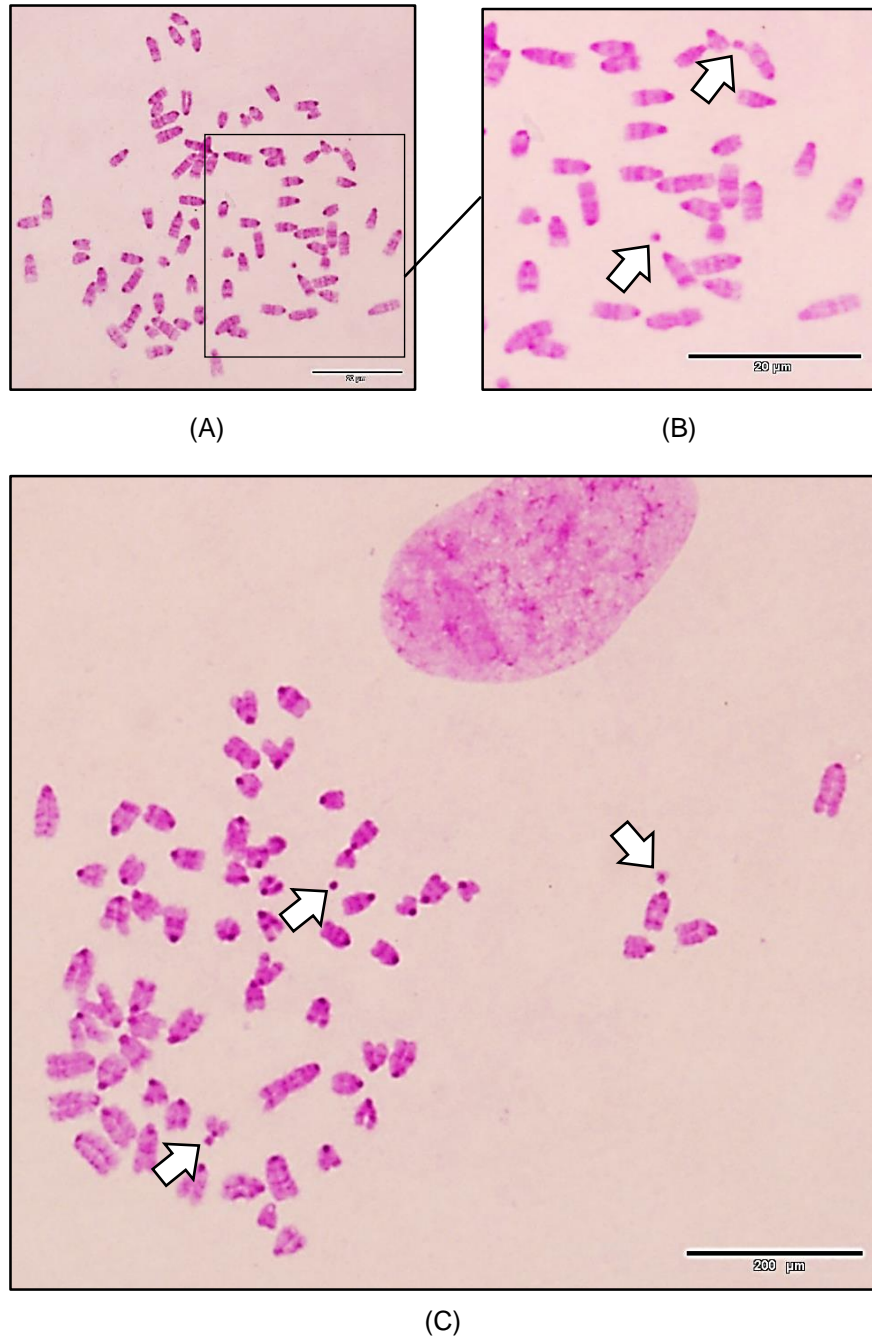


FIGURA 8 – METÁFASES APRESENTANDO POLIPLOIDIA E AMPLIFICAÇÕES EXTRACROMOSSÔMICAS. (A) AMOSTRA A9 EM P15, COM 78 CROMOSSOMOS MAIS AMPLIFICAÇÕES. (B) DETALHE DAS AMPLIFICAÇÕES EXTRACROMOSSÔMICAS (SETAS). (C) AMOSTRA A5 EM P15, COM 64 CROMOSSOMOS MAIS AMPLIFICAÇÕES (SETAS).

FONTE: O autor (2013).

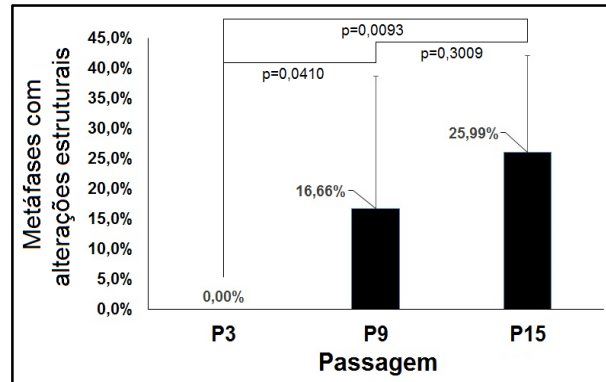


GRÁFICO 12 – PROPORÇÃO DE METÁFASES COM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, POR PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY).

FONTE: O autor (2013).

As amostras com maior frequência de ampliações extracromossômicas por metáfase, em P9, foram: A2 (61,90%); A1 (38,09%); A9 (14,28%); A3 (9,52%); e A7 e A8 (4,76%). Em P15, as alterações foram mais frequentes nas amostras: A4 (52,38%); A1 (42,85%); A5 (38,09%); A10 (22,22%); A6, A8 e A9 (14,28%); e A7 (9,52%).

6.2.3 FISH

Foram utilizadas sondas produzidas a partir de clones do genoma de *Mus musculus*, com *loci* em quatro cromossomos distintos, 5, 10, 15 e X (FIGURA 9). Para cada amostra e passagem foram analisados, no mínimo, 100 núcleos interfásicos, totalizando mais de 1.200 núcleos em cada passagem. Foram identificados núcleos com número de sinais correspondentes a alterações cromossômicas numéricas em todas as amostras e passagens.

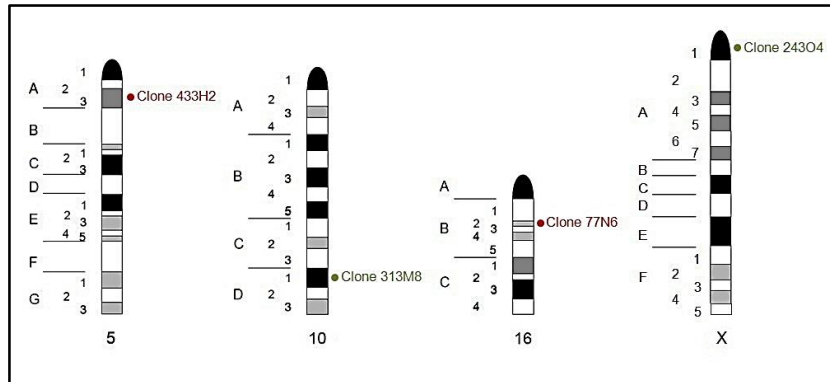


FIGURA 9 – SÍTIOS DE HIBRIDAÇÃO DAS SONDAS UTILIZADAS NO ESTUDO, NOS CROMOSSOMOS DE *Mus musculus*.
FONTE: O autor (2014).

Foram identificados núcleos com número de sinais de hibridação coincidente com alterações numéricas em todas as amostras, nas três passagens selecionadas para análise. Em P3, $14,45\% \pm 11,51\%$ dos núcleos exibiram número de sinais de hibridação anormal, enquanto em P9 e P15 estes corresponderam a $82,05\% \pm 15,96\%$ e $89,81\% \pm 8,92\%$, respectivamente (GRÁFICO 13).

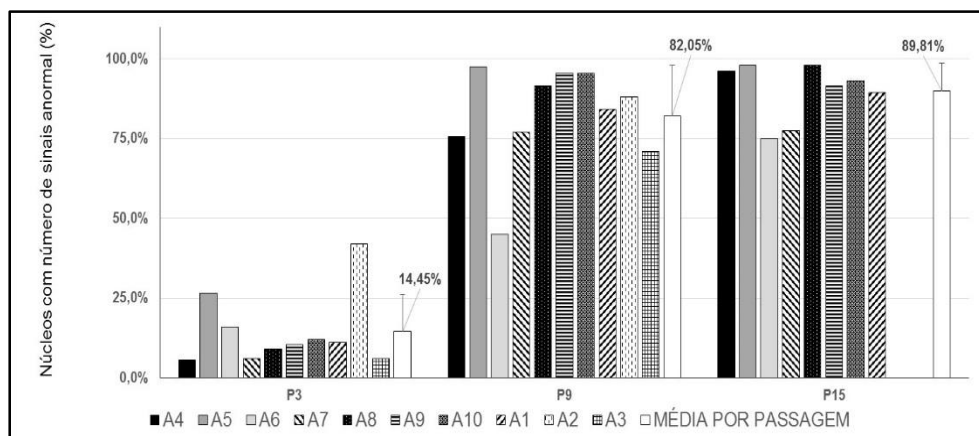


GRÁFICO 13 – PROPORÇÃO DE NÚCLEOS COM NÚMERO DE SINAIS CORRESPONDENTES AO CARIÓTIPO ANORMAL, PARA AS SONDAS UTILIZADAS.
FONTE: O autor (2013).

A maior proporção de núcleos exibindo número de sinais de hibridação correspondentes à normalidade (dissomia) para os dois conjuntos de sondas (FIGURAS 10 e 11) foi identificada na amostra A4 em P3, igual a 94,50%; enquanto a maior proporção de núcleos com número de sinais coincidentes com alterações numéricas (FIGURA 12) correspondeu a 98,00%, identificada nas amostras A5 e A8 em P15 (detalhamento no ANEXO 6).

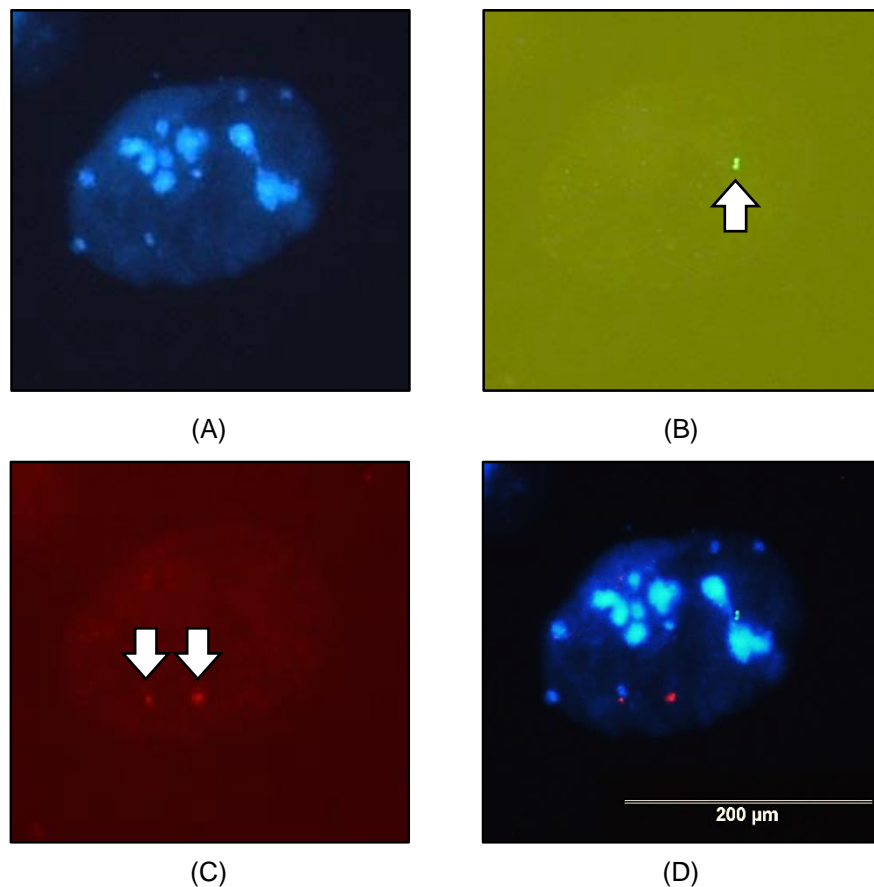


FIGURA 10 – HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO INTERFÁSICO DA AMOSTRA A4 EM P3, APRESENTANDO NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES AO CONJUNTO NORMAL DOS CROMOSSOMOS X E 5. (A) NÚCLEO CORADO COM DAPI. (B) SINAL FLUORESCENTE DA HIBRIDAÇÃO DA SONDA DERIVADA DO CLONE 243O4 (CROMOSSOMO X, BANDA A1), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 495 GREEN. (C) SINAIS DE HIBRIDAÇÃO DA SONDA DERIVADA DO CLONE 433H2 (CROMOSSOMO 5, BANDA A3), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 550 RED/ORANGE. (D) IMAGEM COMBINADA A PARTIR DAS IMAGENS A, B E C.

FONTE: O autor (2013).

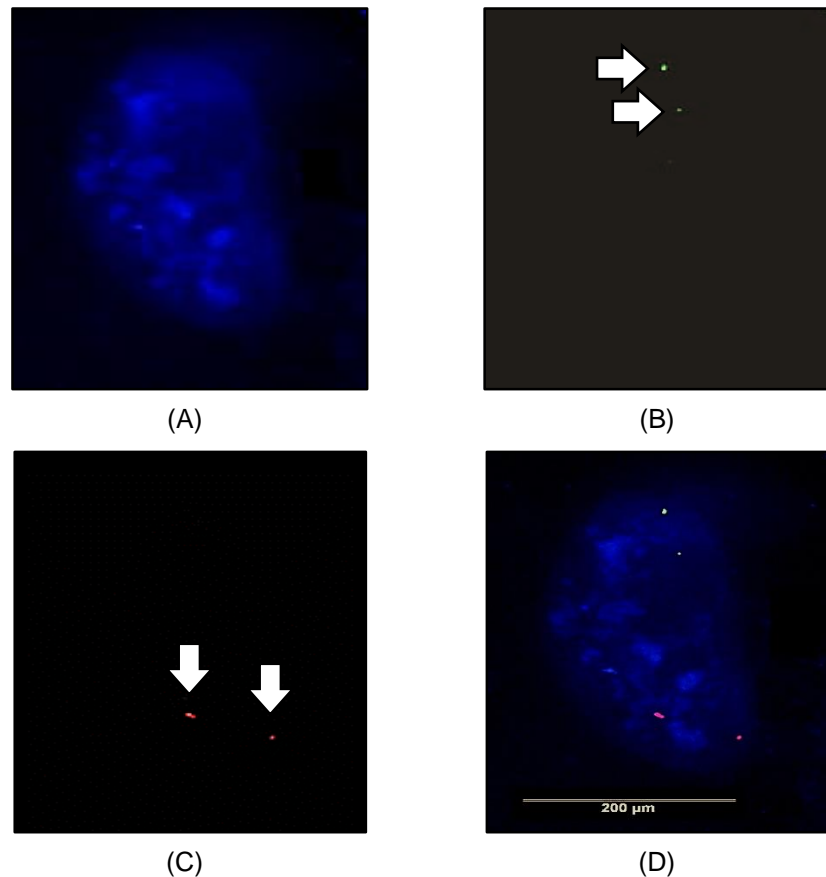


FIGURA 11 – HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO INTERFÁSICO DA AMOSTRA A4 EM P3, APRESENTANDO NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES AO CONJUNTO NORMAL DOS CROMOSSOMOS 10 E 16. (A) NÚCLEO CORADO COM DAPI. (B) HIBRIDAÇÃO COM SONDA DERIVADA DO CLONE 313M8 (CROMOSSOMO 10, BANDA D1, SETAS), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 495 GREEN. (C) HIBRIDAÇÃO COM SONDA DERIVADA DO CLONE 77N6 (CROMOSSOMO 16, BANDA A2, SETAS), MARCADO POR MEIO DO KIT FISHBRIGHT® 550 RED/ORANGE. (D) IMAGEM COMBINADA A PARTIR DAS IMAGENS A, B E C.

FONTE: O autor (2013).

A proporção de núcleos com número de sinais fluorescentes correspondente ao cariótipo normal apresentou redução estatisticamente significativa entre os períodos de análise P3 e P9, P3 e P15, e não diferiu entre P9 e P15 (GRÁFICO 14).

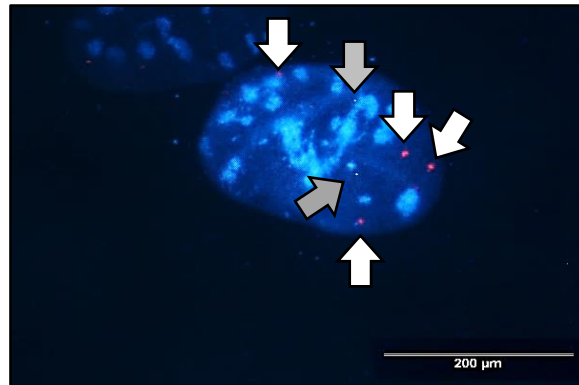


FIGURA 12 – HIBRIDAÇÃO EM NÚCLEO COM NÚMERO DE SINAIS FLUORESCENTES CORRESPONDENTES À TETRASSOMIA. SETAS CINZAS: CROMOSSOMOS X. SETAS BRANCAS: CROMOSSOMOS 5.

FONTE: O autor (2013).

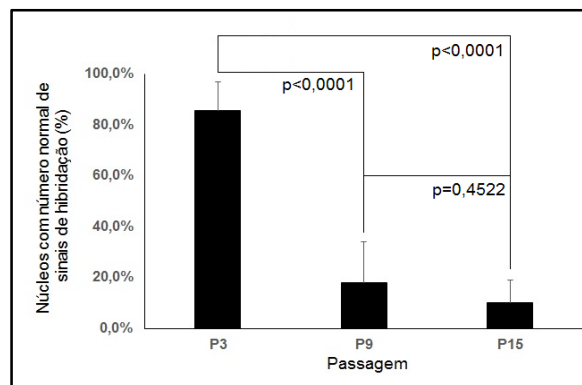


GRÁFICO 14 – PROPORÇÃO DE NÚCLEOS COM NÚMERO NORMAL DE SINAIS POR SONDA, POR PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY).

FONTE: O autor (2013).

Quanto ao número médio de cromossomos, a técnica de FISH evidenciou o aumento, principalmente entre P3 e P9 ($p < 0,01$), representado pelo aumento de núcleos aneuplóides, de $5,60\% \pm 6,82\%$ para $42,40\% \pm 15,23\%$; de núcleos com

tetrassomias de $8,60\% \pm 6,59\%$ para $32,95\% \pm 14,11\%$; e de núcleos com polissomias de $0,30\% \pm 0,50\%$ para $6,70\% \pm 5,37\%$ (GRÁFICO 15).

Entre as passagens P9 e P15, diferentemente do que foi identificado por cariotipagem, também foi observada redução significativa ($p < 0,01$) na proporção de núcleos normais, com aumento dos núcleos aneuplóides. Também as frequências de núcleos com tetrassomias e polissomias diferiu significativamente entre essas passagens ($p < 0,01$).

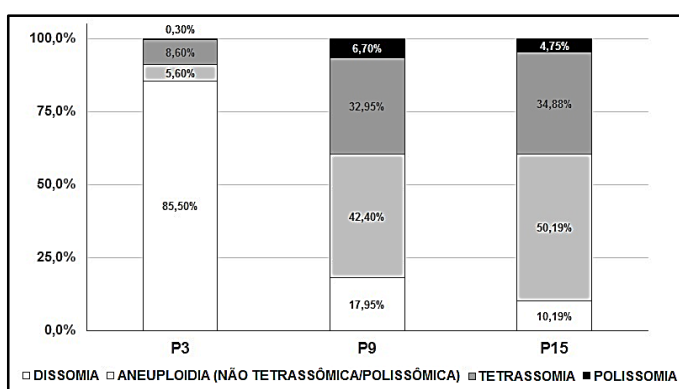


GRÁFICO 15 – SOMIAS DETECTADAS POR FISH POR PASSAGEM DO CULTIVO.

FONTE: O autor (2014).

6.2.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Células da última passagem do cultivo de cada amostra (P15 para as amostras A1, A4-A10; P13 para A2 e P10 para A3) e células criopreservadas em P3 e P9 das amostras A2 e A3, bem como células cultivadas do tumor de Ehrlich, foram avaliadas quanto à expressão dos marcadores CD34, CD45, CD73, CD90.1, CD105, e viabilidade, por meio da análise da ligação ao corante Anexina-7AAD.

A expressão do marcador foi considerada negativa (-) quando a intensidade média de fluorescência no *pool* celular sob avaliação não diferia significativamente da fluorescência média no controle celular e/ou no controle isotópico; positiva, com expressão moderada (+) quando a média do *pool* celular avaliado foi $\cong 10\times$ maior que a média do controle celular e/ou controle isotópico; e positiva, com forte expressão (++), quando a diferença foi de $\cong 10^2\times$.

As amostras apresentaram viabilidade média elevada (96,39%±5,66%) e perfil negativo quanto à expressão dos marcadores CD34 (+ ≤3,26%), CD45 (+ ≤2,69%) e CD90.1 (+ ≤1,19%). À exceção da amostra A5 (CD73⁺, 31,55%), todas as demais se mostraram negativas também para a expressão de CD73 (+ ≤2,69%).

Quanto à expressão do marcador CD105, foram identificados três perfis (TABELA 5): (1) expressão na quase totalidade do *pool* celular (CD105⁺ e/ou CD105⁺⁺ ≥99,02%); (2) expressão em apenas uma fração celular (CD105⁺ ≤44,02%) ou variação de negativa a moderada (CD105^{-/+} ≥98,25%); e (3) ausência de expressão no *pool* celular (CD105⁻ ≥99,42%).

TABELA 5 – PERFIS DE EXPRESSÃO PARA O MARCADOR CD105 NAS AMOSTRAS DE CTMA CULTIVADAS.

PERFIL	CD105	AMOSTRAS
1	++ (99,02%) e - (0,98%)	A8
	-/+ (99,56%) e - (0,44%)	A9
	+ (≥99,08%) e - (≤0,92%)	A1, A4
	+ (≥16,65%) e -/+ (≥36,20%)	A6 e A7
2	+ (44,02%) e - (55,98%)	A5
	-/+ (98,25%) e - (1,75%)	A10
	- (≥99,42%)	A2(P13), A3(P10)
AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS		
2	+ (71,47%) e -/+ (28,53%)	A2(P3)
2	+ (48,32%) e -/+ (51,68%)	A2(P9)
2	+ (71,58%) e - (28,42%)	A3(P3)
3	- (99,32%)	A3(P9)

LEGENDA: ++ EXPRESSÃO FORTE; + EXPRESSÃO MODERADA; – NÃO EXPRESSO (POPULAÇÃO NEGATIVA); -/+ EXPRESSÃO VARIANDO DE NEGATIVA A MODERADA NA MESMA POPULAÇÃO CELULAR; -/+ EXPRESSÃO VARIANDO DE NEGATIVA A FORTE NA MESMA POPULAÇÃO CELULAR.

FONTE: O autor (2013).

O perfil 1 foi identificado nas amostras A1, A4, A8 e A9 (FIGURA 13). Nas amostras A1, A4 e A8 foram detectadas populações celulares com expressão homogênea de CD105. A1 e A4 foram caracterizadas como CD105⁺ (≥99,08%), enquanto a amostra A8 foi caracterizada como CD105⁺⁺ (≥99,02%). Já a amostra A9, também classificada no perfil 1, apresentou variação na intensidade de expressão de CD105 de negativa à forte expressão (CD105^{-/+} 99,56%).

O perfil 2 foi identificado nas amostras A5, A6, A7 (FIGURA 14) e A10 (FIGURA 15). Nas amostras A5, A6 e A7 foram detectadas duas subpopulações celulares, uma caracterizada como CD105⁺ (≥16,65%) e outra como CD105⁻

(55,98%) na amostra A5; e como CD105^{-/+} ($\geq 36,20\%$) nas amostras A6 e A7. Na amostra A10 foi identificada um único *pool* celular com variação na expressão do marcador, de negativa a positiva moderada (CD105^{-/+} 98,25%).

O perfil 3, caracterizado como de não expressão de CD105, foi identificado nas amostras A2 em P13 e A3 em P10 (CD105⁺ $\leq 0,53\%$, FIGURA 16). Este perfil foi o identificado também na alíquota criopreservada da amostra A3 em P9 (CD105⁺ 0,68%), que também se mostrou negativa para os outros marcadores estudados (CD34⁻ 98,91%, CD45⁻ 99,60%, CD73⁻ 99,06% e CD90.1⁻ 98,59%).

Quanto às demais alíquotas criopreservadas, as da amostra A2 em P3 (FIGURA 17) e P9 exibiram duas subpopulações, uma com expressão homogênea do marcador, caracterizada como CD105⁺, que correspondeu a 71,47% e 48,32% das células em P3 e P9, respectivamente; e outra subpopulação exibindo variação na expressão desse marcador, caracterizada como CD105^{-/+} (28,53% em P3 e 51,68% em P9). Ambas alíquotas exibiram perfil negativo para a expressão dos demais marcadores (CD34⁺ $\leq 2,72\%$, CD45⁺ $\leq 0,42\%$, CD73⁺ $\leq 1,27\%$ e CD90.1⁺ $\leq 0,79\%$).

Também a alíquota criopreservada da amostra A3 em P3 (FIGURA 18) apresentou duas subpopulações, sendo porém, uma com expressão homogênea do marcador (CD105⁺ 71,47%) e outra negativa (CD105⁻, 28,42%). Quanto aos demais marcadores, essa alíquota foi classificada como negativa (CD34⁻ 97,28%, CD45⁻ 99,85%, CD73⁻ 97,71% e CD90.1⁻ 97,79%)

Quanto às células cultivadas do tumor de Ehrlich, estas também exibiram elevada viabilidade (99,19%) e ausência de expressão de todos os marcadores sob análise: CD34⁻ (CD34⁺ $\leq 1,77\%$), CD45⁻ (CD45⁺ $\leq 0,09\%$), CD73⁻ (CD73⁺ $\leq 0,22\%$), CD90.1⁻ (CD90.1⁺ $\leq 0,19\%$) e CD105⁻ (CD105⁺ $\leq 0,10\%$).

Os resultados para a expressão do marcador CD105 nas amostras A2 e A3 nas passagens nas quais seus cultivos foram interrompidos, combinados aos da avaliação das alíquotas criopreservadas em P3 e P9 mais a variação identificada nas demais amostras em P15, evidenciou a ocorrência de perda de expressão do marcador CD105 durante o cultivo de CTMA (FIGURA 19).

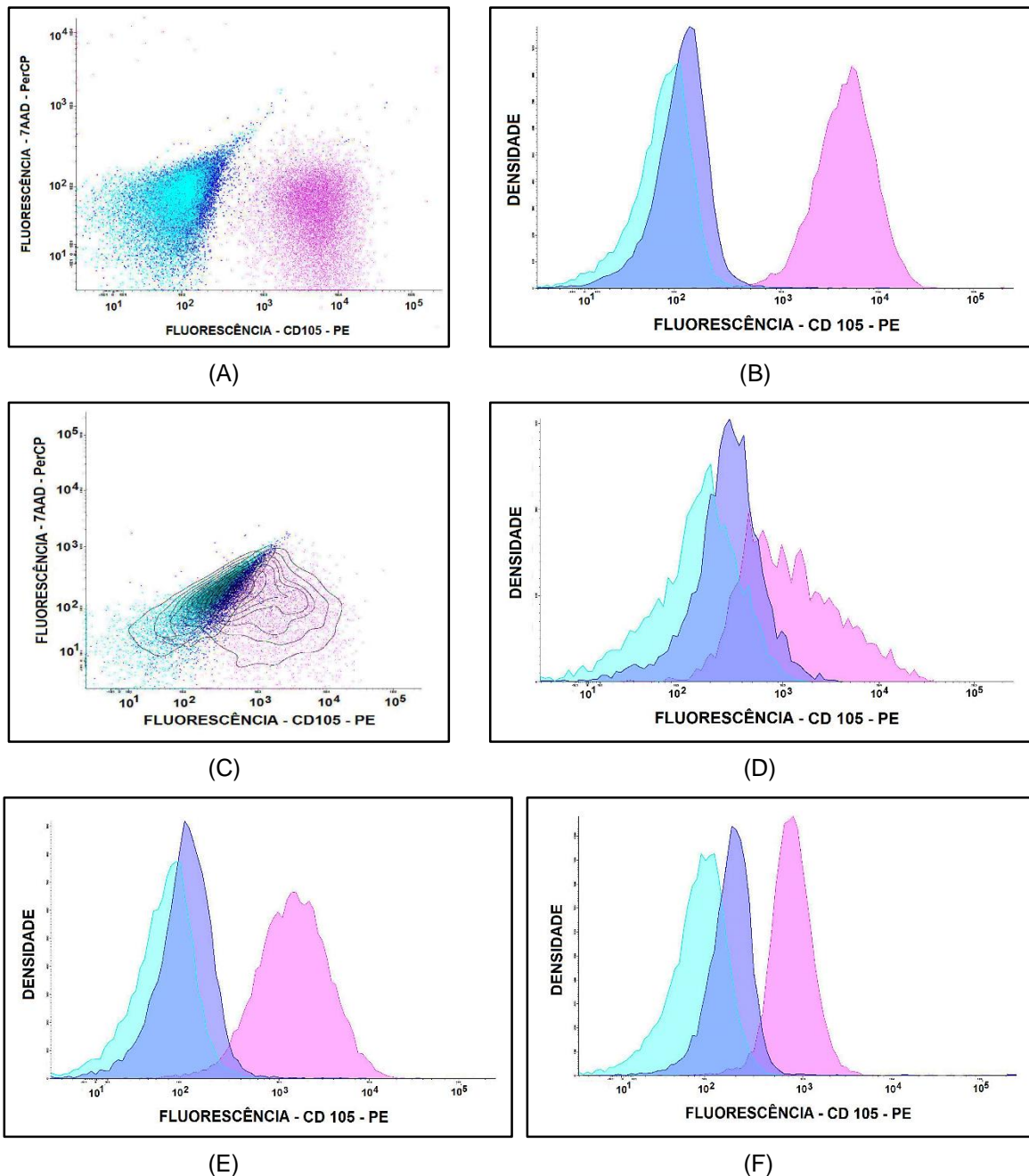


FIGURA 13 – CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A1, A4, A8 E A9, EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA 8. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A9. (E) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A1. (F) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A4.

FONTE: O autor (2014).

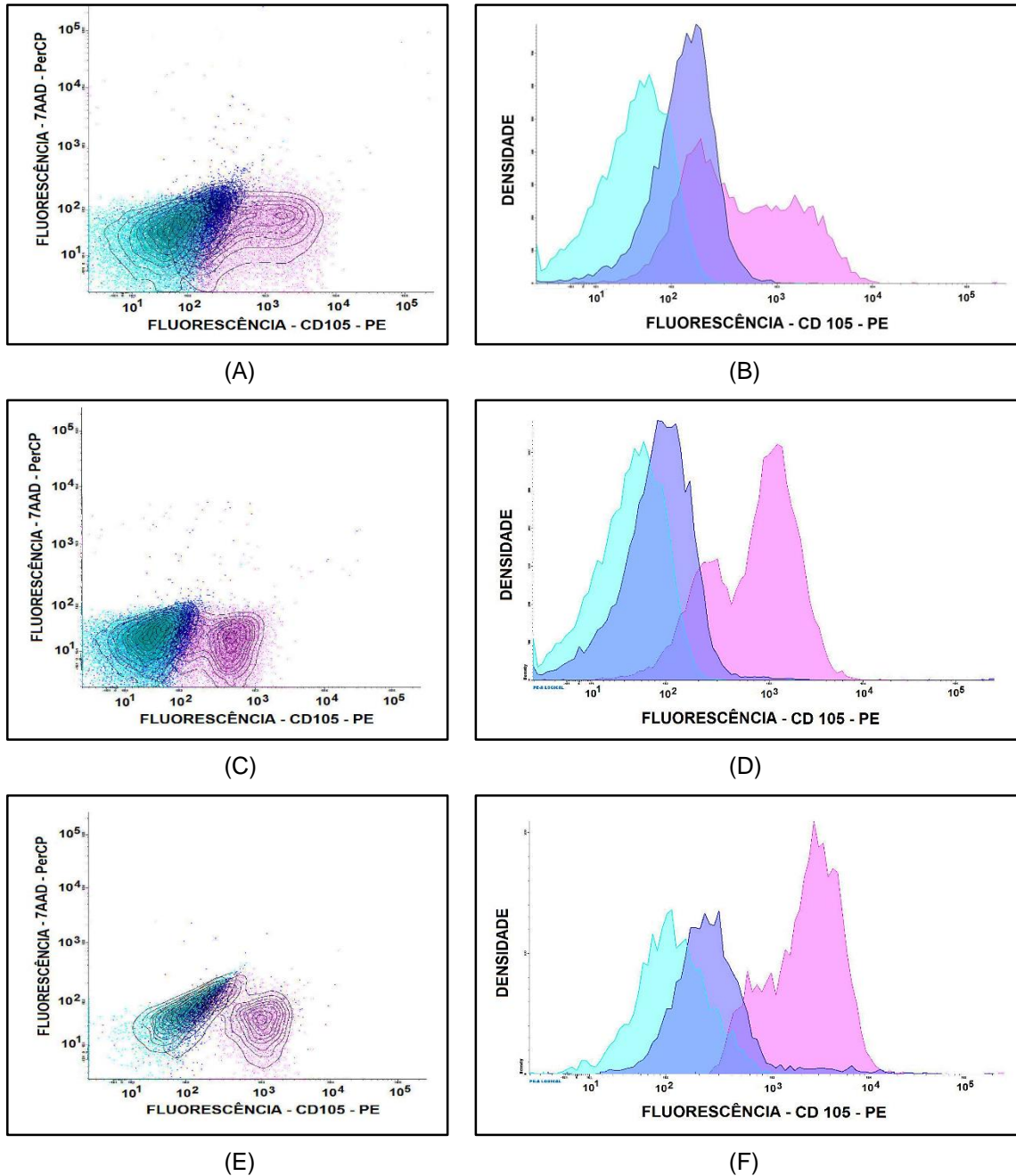


FIGURA 14 – CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A5, A6 E A7, EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A5. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A6. (E) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (F) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA AMOSTRA A7.

FONTE: O autor (2014).

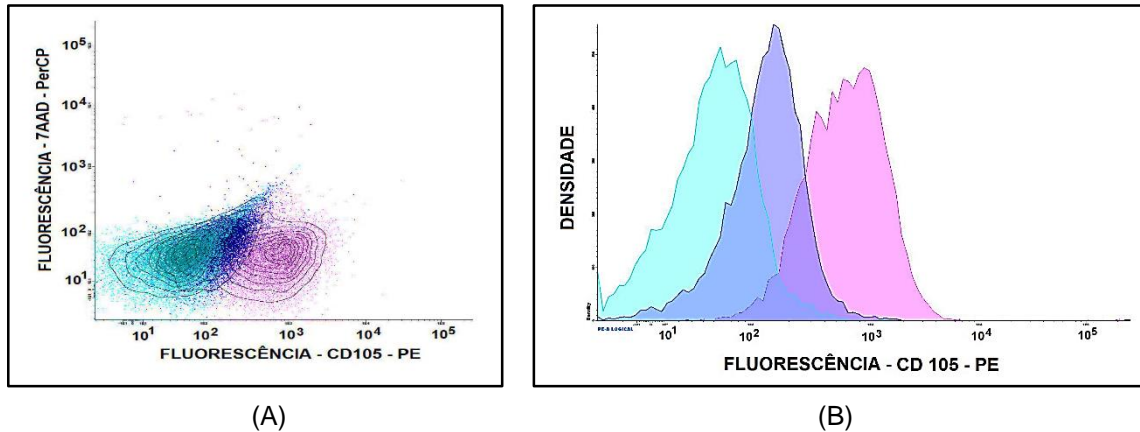


FIGURA 15 – CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A10 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE. (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).

FONTE: O autor (2014).

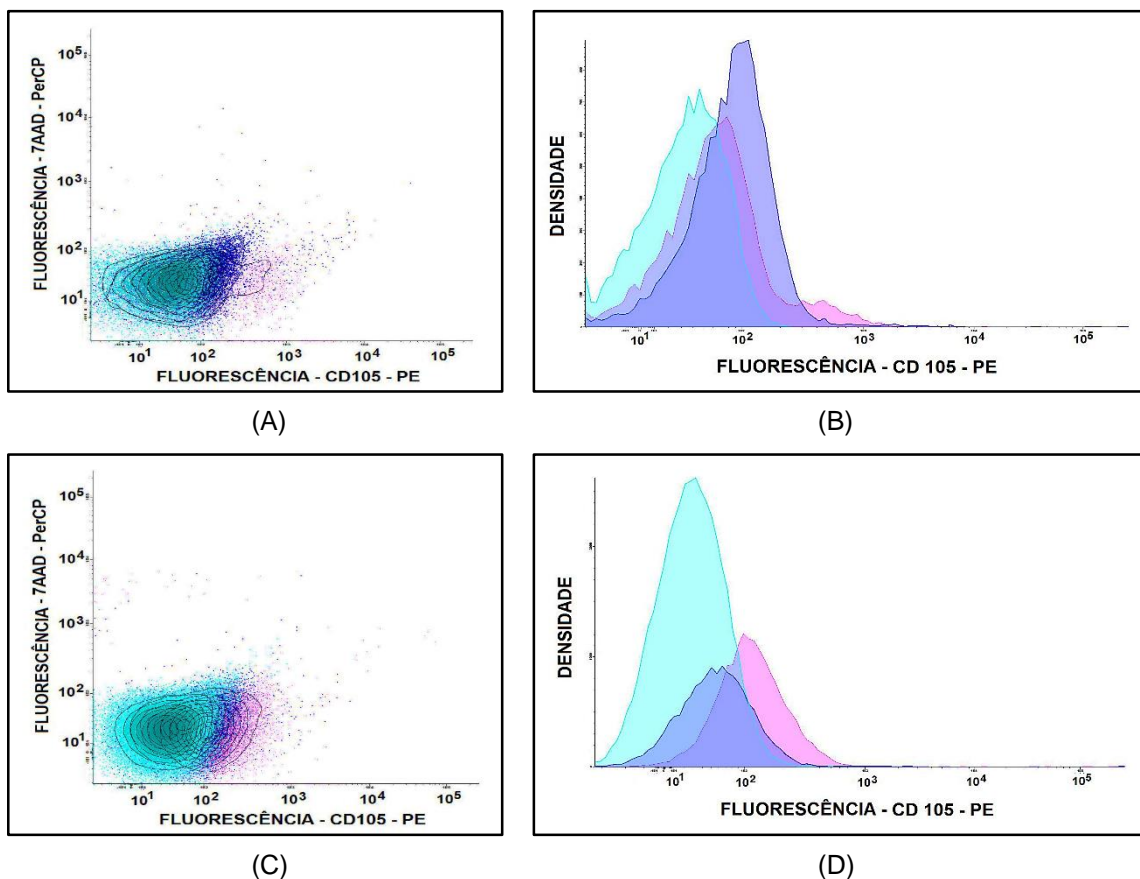


FIGURA 16 – CITOMETRIA DE FLUXO DAS AMOSTRAS A2 (P13) E A3 (P10) EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), CÉLULAS MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A) DA MESMA DA AMOSTRA A2. (C) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (D) HISTOGRAMA DA AMOSTRA A3.

FONTE: O autor (2014).

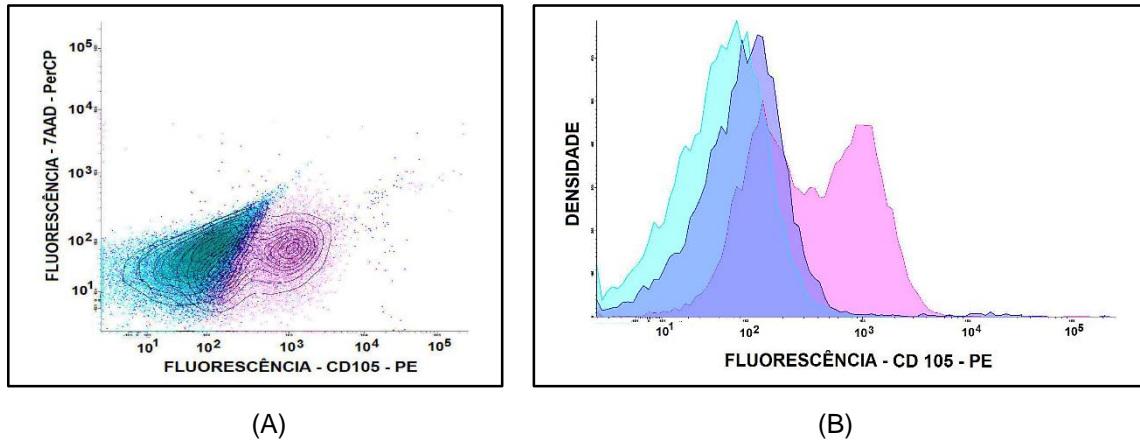


FIGURA 17 – CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A2 EM P3 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).

FONTE: O autor (2014).

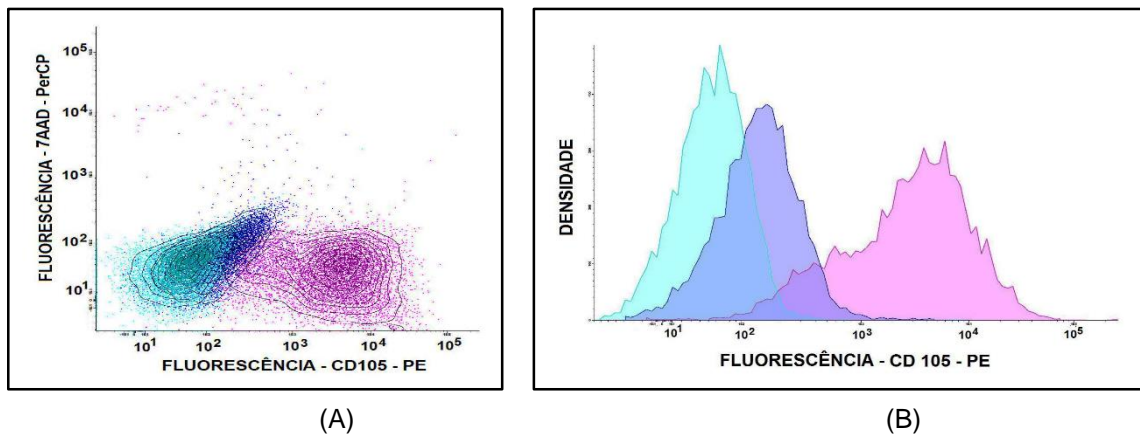


FIGURA 18 – CITOMETRIA DE FLUXO DA AMOSTRA A3 EM P3 EXIBINDO ESPECTRO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS NÃO MARCADAS (AZUL CLARO), MARCADAS COM ANTICORPOS ISOTIPOS (AZUL ESCURO) E COM ANTICORPOS ANTI-CD105 (ROSA). (A) DOT-PLOT (PerCP x PE-A) COM CURVAS DE DENSIDADE E (B) HISTOGRAMA (DENSIDADE x PE-A).

FONTE: O autor (2014).

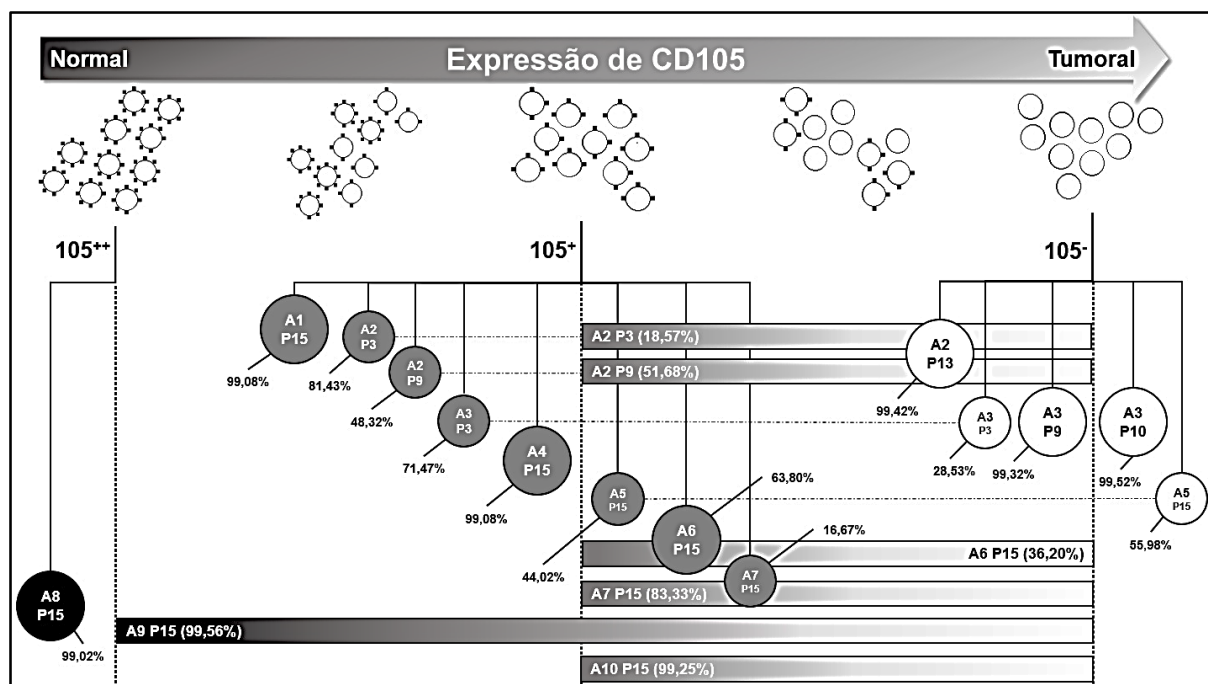


FIGURA 19 – HIPÓTESE SOBRE A PERDA DE EXPRESSÃO DO MARCADOR CD105 DURANTE O CULTIVO CELULAR. CÍRCULOS AGRUPADOS NA PORÇÃO SUPERIOR REPRESENTAM CÉLULAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE CD105. CÍRCULOS E BARRAS HORIZONTAIS NA METADE INFERIOR DA FIGURA REPRESENTAM POPULAÇÕES CELULARES DAS DIFERENTES AMOSTRAS. LINHAS PONTILHADAS HORIZONTAIS LIGAM SUBPOPULAÇÕES CELULARES COM DIFERENTES PERFIS DE EXPRESSÃO NA MESMA AMOSTRA E PASSAGEM. A INTENSIDADE DE COR DECRESCENTE DA ESQUERDA PARA A DIREITA REPRESENTA A REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DO MARCADOR.

FONTE: O autor (2014).

6.2.5 Diferenciação celular adipogênica e osteogênica *in vitro*

Todos as amostras cultivadas até P15 mantiveram, nesta passagem, potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica, exibindo perfil *in vitro* compatível com estas diferenciações (FIGURA 20). Também a amostra A2, cujo cultivo foi interrompido em P13, exibiu nesta passagem, perfil compatível com o dessas diferenciações (FIGURA 21). O cultivo A3, interrompido em P10, não foi submetido à diferenciação devido às suas células apresentarem proliferação em suspensão, sem adesão ao frasco de cultivo.

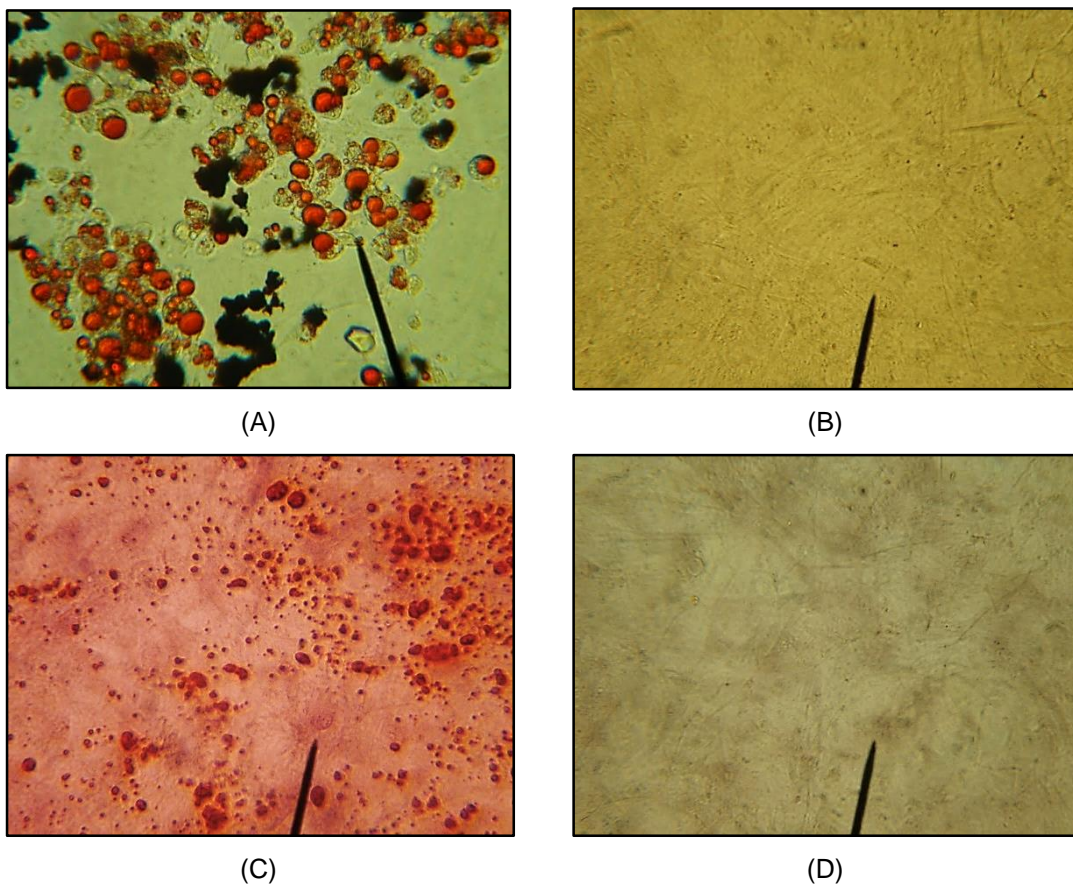


FIGURA 20 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EXIBIDO PELAS AMOSTRAS A1, A4-A10 EM P15. (A) DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (B) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (C) DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA. (D) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.

FONTE: O autor (2013).

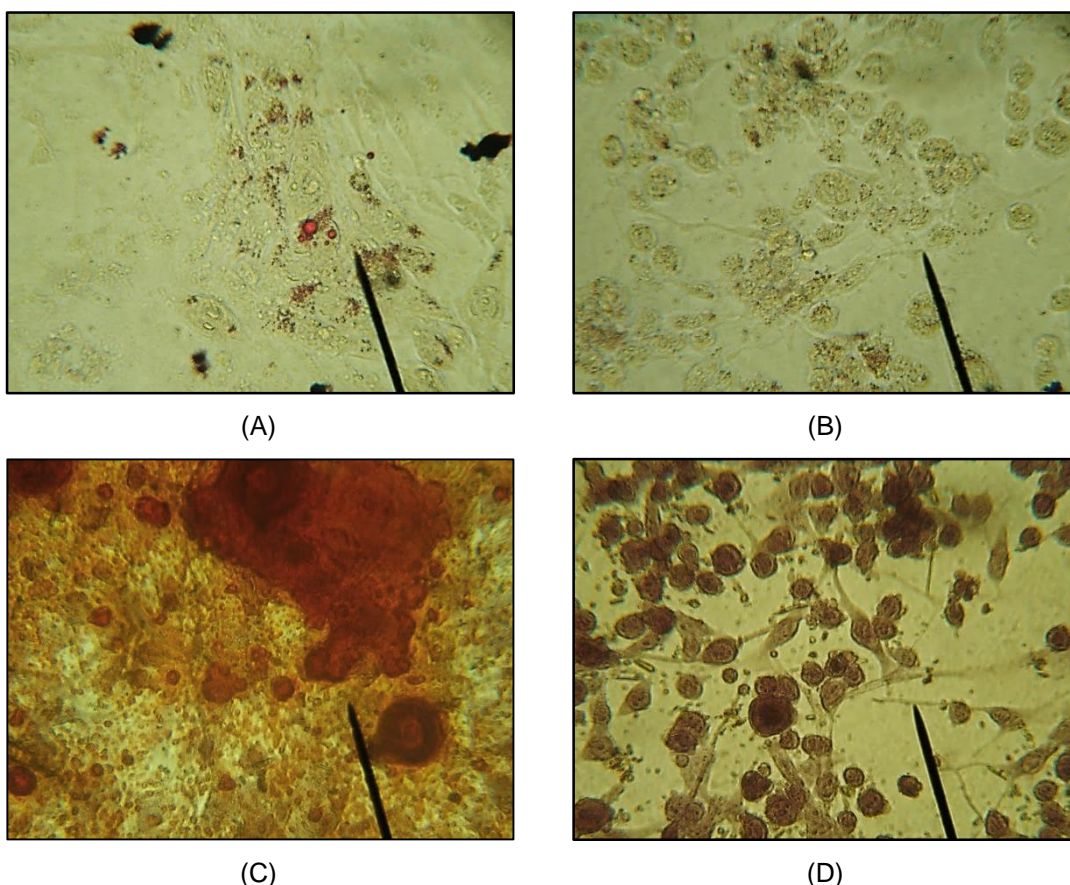


FIGURA 21 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EXIBIDO PELA AMOSTRA A2 EM P13. (A) DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (B) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA. (C) DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA. (D) CONTROLE NEGATIVO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.

FONTE: O autor (2013).

6.2.6 Avaliação do potencial tumorigênico *in vivo*

Células da última passagem do cultivo de cada amostra (P15, para as amostras A1, A4-A10; P13 para A2 e P10 para A3) foram avaliadas quanto ao potencial tumorigênico *in vivo*, por meio da inoculação em camundongos fêmeas da linhagem imunodeficiente NOD.CB17-Prkdc(scid)/J.

Os inóculos foram constituídos de alíquotas de 5×10^5 células acondicionadas em 500 μ L de PBS estéril. A viabilidade celular média nos inóculos, obtida por meio da coloração de azul de trypan e contagem em hemocitômetro, foi de $94,96\% \pm 0,02\%$, com valores mínimo e máximo iguais a $90,69\% \pm 4,80\%$ e $98,61\% \pm 1,92\%$, respectivamente. Cada inóculo foi dispensado por meio de injeção

subcutânea no flanco direito de cada animal, um inóculo por amostra e por animal (FIGURA 22).

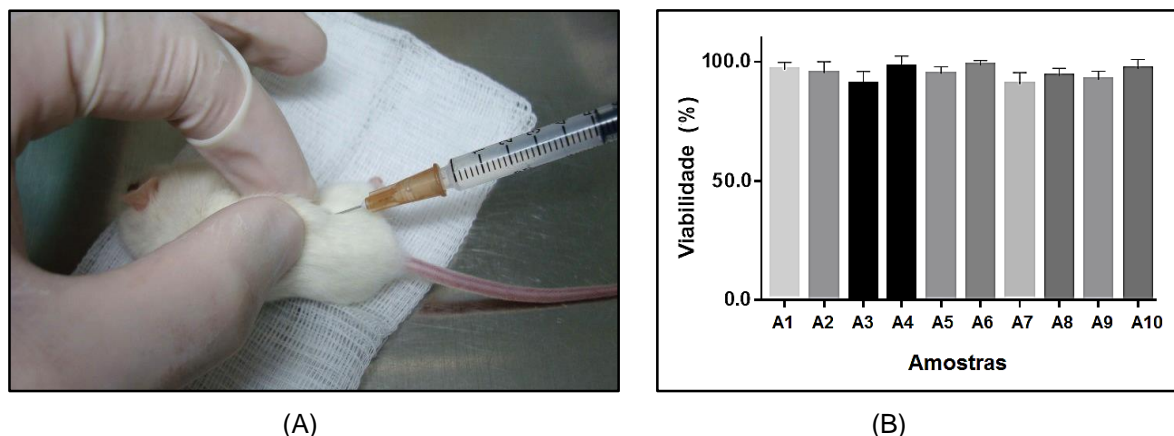


FIGURA 22 – INOCULAÇÃO DE CTMA EM ANIMAIS IMUNODEFICIENTES. (A) INJEÇÃO SUBCUTÂNEA. (B) VIABILIDADE CELULAR MÉDIA DE CADA INÓCULO. FONTE: O autor (2013).

A inoculação de células de oito amostras (A1, A4-A10) não exibiu sinais de tumoração durante o período de avaliação de sessenta dias (FIGURA 23), enquanto as células provenientes das amostras A2 e A3, assim como das células do tumor de Ehrlich (controle positivo), resultaram em processos tumorais locais. Para a inoculação da amostra A2, foi observada também a ocorrência de infiltração com inchaço abdominal compatível com tumoração ascítica, aos quarenta e cinco dias de avaliação (FIGURA 24).

Os animais inoculados com as amostras A2, A3 e do controle positivo, exibiram sinais de tumoração já à primeira avaliação por palpação, cinco dias após a inoculação. O animal inoculado com a amostra A2 exibiu, aos 45 dias de avaliação, inchaço abdominal sugestivo de tumoração ascítica.

Estes animais foram submetidos à eutanásia antes de se completarem 60 dias de avaliação, devido à identificação de pontos sugestivos de necrose na pele sobrejacente ao processo tumoral ou letargia. O animal inoculado com a amostra A3 foi submetido à eutanásia aos 30 dias, e do controle positivo, aos 34 dias, ambos devido à observação de sinais de necrose.

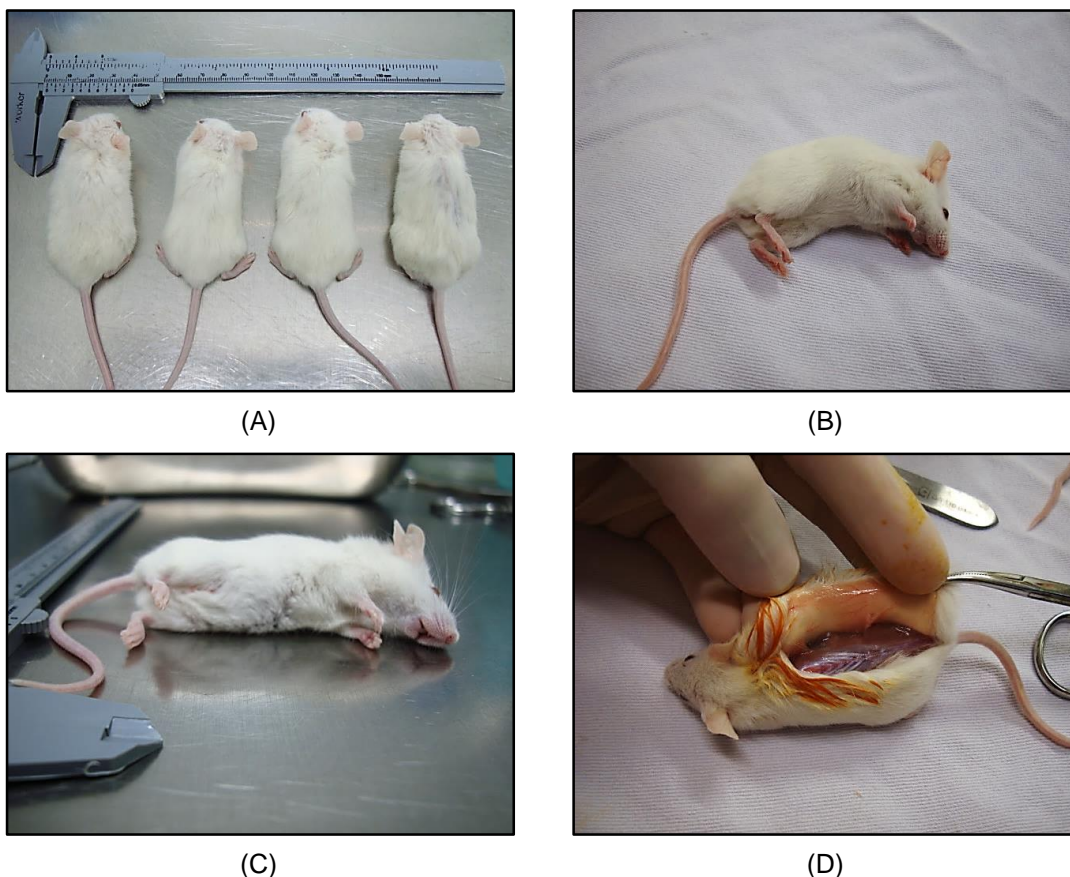


FIGURA 23 – CAMUNDONGOS FÊMEAS DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 60 DIAS APÓS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA DE CTMA CULTIVADAS. (A) ANIMAIS INOCULADOS COM AS AMOSTRAS A4, A7, A9 E A1, RESPECTIVAMENTE. (B) ANIMAL INOCULADO COM A AMOSTRA A5. (C) ANIMAL INOCULADO COM A AMOSTRA A6. (D) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEL TUMORAÇÃO, NO MESMO LOCAL DA INSERÇÃO DO INÓCULO DA AMOSTRA A10.

FONTE: O autor (2013).

Aos 50 dias de avaliação, o animal inoculado com a amostra A2 foi submetido à eutanásia devido à letargia apresentada. Deste animal foram coletados 5 mL de líquido peritoneal, contendo $1,67 \times 10^8$ células com viabilidade média, obtida por meio da coloração por azul de trypan e contagem em hemocítômetro, de $79,76\% \pm 5,05\%$; também foi extraído tumor sólido com massa de 4,28 g, correspondente a 12,49% do peso do animal (após coleta do líquido peritoneal) (FIGURA 24).

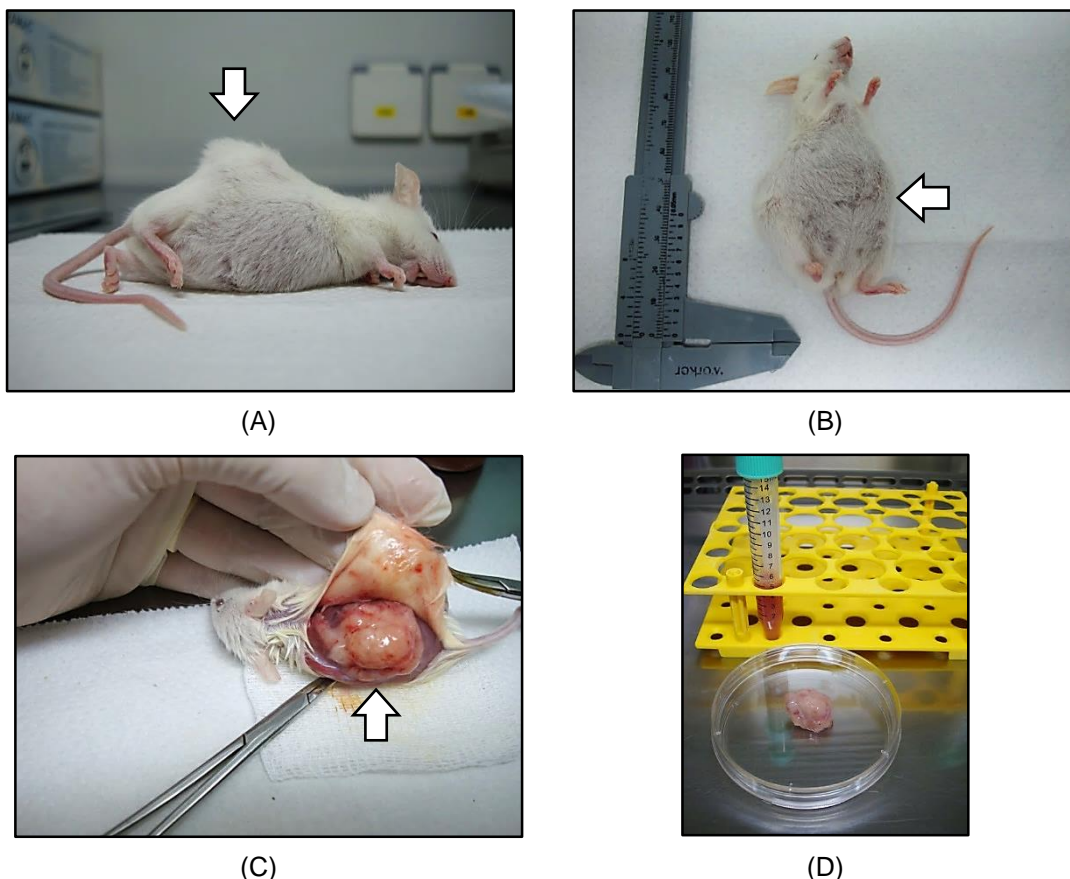


FIGURA 24 – CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 50 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DA AMOSTRA A2. EVIDENCIAM-SE: (A) A PRESENÇA DE PROCESSO TUMORAL SÓLIDO SOB A PELE (SETA) E (B) INCHAÇO VENTRAL DEVIDO À INFILTRAÇÃO NA CAVIDADE ABDOMINAL (SETA). (C) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR SUBCUTÂNEO (SETA). (D) LÍQUIDO ABDOMINAL (TUMOR ASCÍTICO) E TUMOR SÓLIDO COLETADOS.

FONTE: O autor (2013).

Do animal inoculado com a amostra A3, foi extraído tumor sólido subcutâneo com massa de 1,56 g, correspondente a 6,00% do peso do animal (FIGURA 25). Também do animal inoculado com o controle positivo foi extraído tumor sólido subcutâneo (FIGURA 26), o qual apresentou aspecto macroscópico similar ao dos tumores removidos dos animais inoculados com as amostras A2 e A3.

As células recuperadas em meio de cultivo a partir de fragmentos dos tumores derivados das amostras A2 e A3 foram avaliadas imunofenotipicamente por meio de citometria de fluxo e apresentaram o mesmo perfil 3, comum às amostras A2 em P13; A3 em P10 e P9 (alíquota criopreservada) e do tumor de Ehrlich, como descrito anteriormente (seção 6.2.4).

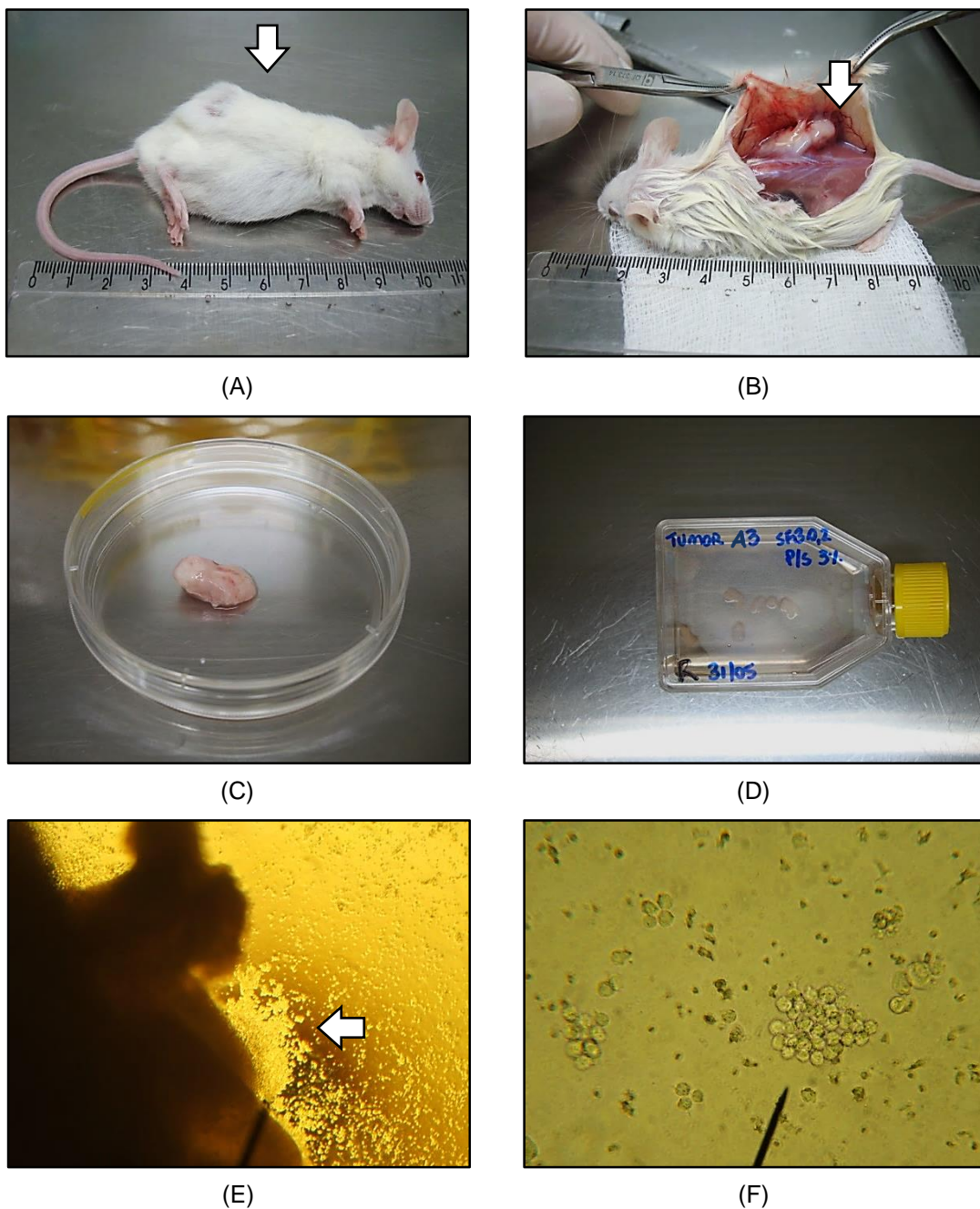


FIGURA 25 – CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 30 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DA AMOSTRA A3. (A) OBSERVAÇÃO DA PRESENÇA DE PROCESSO TUMORAL SÓLIDO SOB A PELE (SETA). (B) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR (SETA). (C) TUMOR SÓLIDO EXTRAÍDO. (D) TRANSFERÊNCIA DE EXPLANTES DO TUMOR PARA GARRAFA DE CULTIVO. (E) CÉLULAS EXTRAVASANDO DO EXPLANTE PARA O MEIO DE CULTIVO (SETA). (F) CÉLULAS EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTIVO.

FONTE: O autor (2013).

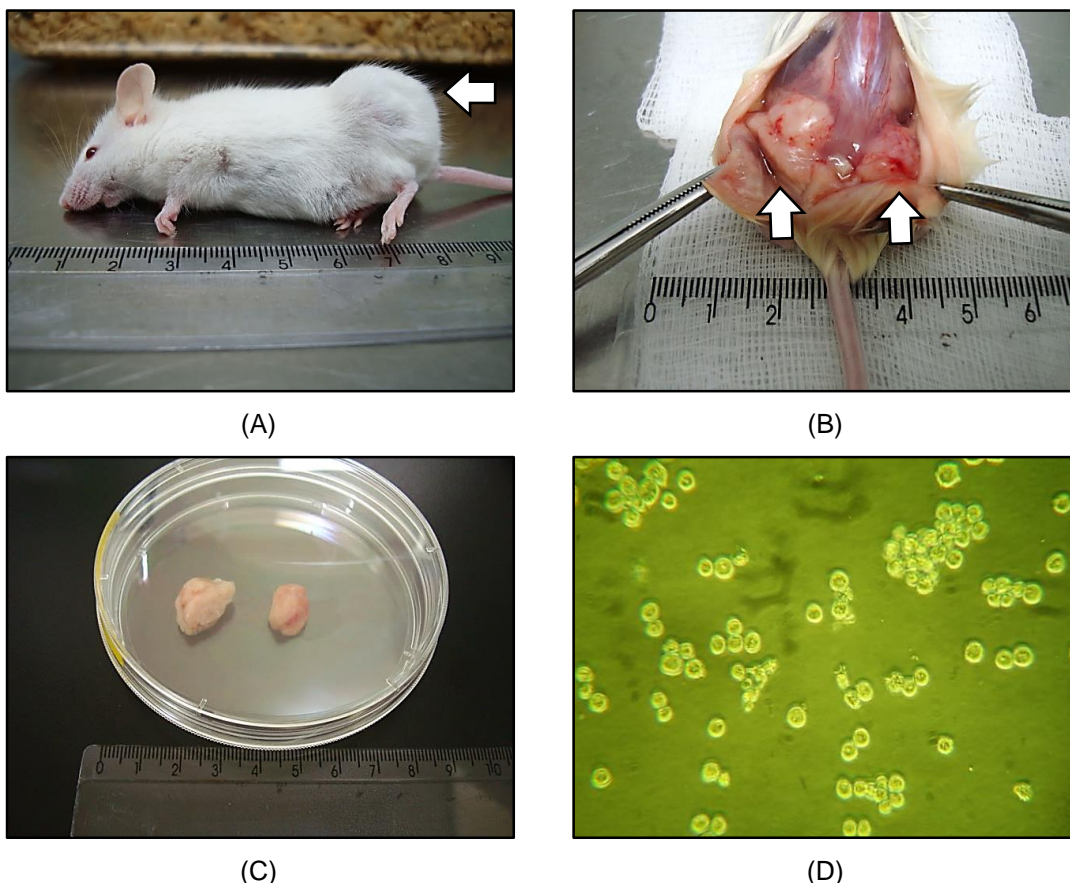


FIGURA 26 – CAMUNDONGO FÊMEA DA LINHAGEM IMUNODEFICIENTE NOD.CB17-PRKDC(SCID)/J, 34 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DO CONTROLE POSITIVO (TUMOR DE EHRLICH). (A) PRESENÇA DE TUMOR SÓLIDO SOB A PELE (SETA). (B) CIRURGIA EXPLORATÓRIA PARA REMOÇÃO DO TUMOR (SETAS). (C) TUMORES SÓLIDOS EXTRAÍDOS. (D) CÉLULAS PROVENIENTES DE EXPLANTES DOS TUMORES, EM SUSPENSÃO NO MEIO DE CULTIVO.

FONTE: O autor (2013).

6.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES IDENTIFICADOS

Três fragmentos dos tumores sólidos derivados das amostras A2 e A3 foram encaminhados para avaliação histopatológica. Para ambos, foi evidenciado “aspecto histológico condizente com processo neoplásico maligno indiferenciado com células redondas pequenas e células epitelióides” (ANEXO 7).

Dentre os achados histológicos, destacam-se as atipias, representadas por multinucleação, macronúcleos, cromatina grosseira e irregular; a atividade mitótica elevada, com mitoses atípicas; e extensas áreas de necrose (FIGURA 27).

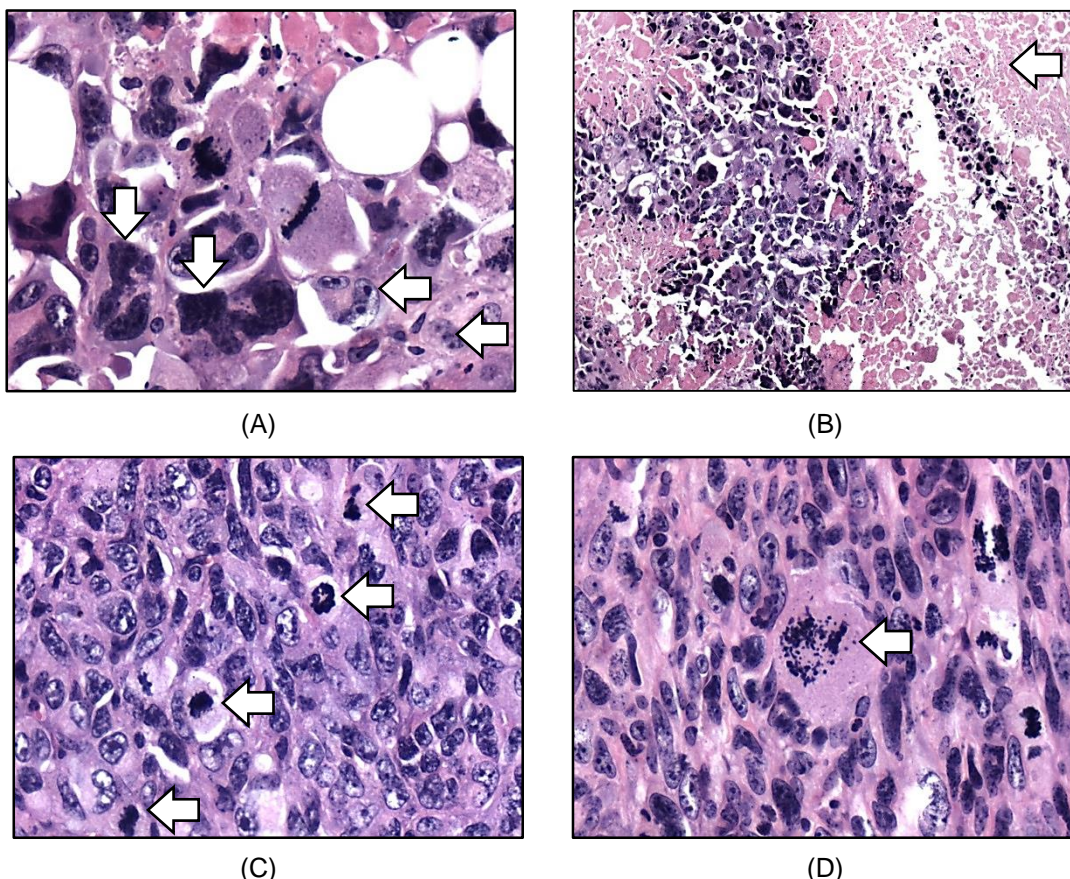


FIGURA 27 – FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES DERIVADOS DAS AMOSTRAS A2 (A E B) E A3 (C E D), CORADOS COM HEMATOXILINA/EOSINA. DESTACAM-SE: (A) NÚCELOS COM CROMATINA GROSSEIRA (SETAS VERTICAIS) (400x) E MACRONÚCLOES (SETAS HORIZONTAIS) (100x); (B) EXTENSA ÁREA DE NECROSE (SETA) (100x); (C) CÉLULAS EM MITOSE (SETAS); (D) MITOSE ATÍPICA (SETA) (100x).

FONTE: O autor (2013).

6.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS

As alterações identificadas por meio dos diferentes métodos de análise aplicados encontram-se compiladas na Tabela 6. Para se estimar a correlação dos resultados obtidos por meio das diferentes técnicas de análise utilizadas nestes estudo, considerou-se os resultados das técnicas Papanicolaou, cariotipagem e FISH como quantitativos contínuos, expressos sob a forma de médias e seus respectivos desvios; os da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo como qualitativos ordinais, sendo cada perfil identificado (1-3) um estadiamento na escala de expressão do marcador CD105; e os da tumorigênese *in vivo* como

qualitativos nominais (formação ou não do tumor) (RIUS DIAZ, BARON LOPES, 2007).

Assim, a correlação dos resultados das técnicas Papanicolaou, cariotipagem e FISH foi estimada por meio do teste de Pearson; enquanto a correlação dos resultados dessas e os das técnicas de imunofenotipagem e tumorigênese, pelo teste de Wilcoxon. Os resultados destas duas entre si foram comparados por meio do teste estatístico qui-quadrado (TABELAS 7 e 8).

TABELA 6 – RESUMO DAS ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS NOS CULTIVOS DE CTMA.

CULTIVO E PASSAGEM		PAPANICOLAOU (ALTERAÇÃO - %)	RESULTADOS EM CADA MÉTODO DE ANÁLISE				
			CARIOTIPAGEM (CARIÓTIPO ALTERADO - %)	FISH (NÚCLEOS ANORMAIS - %)	DIFERENCIAÇÃO (OSTEO/ ADIPOGÊNICA)	IMUNOFENOTIPAGEM (PERFIL) (CD105)	TUMORIGÊNESE <i>IN VIVO</i>
A1	P3	0,55	20,00	11,00	NA	NA	NA
	P9	1,52	100,00	84,00	NA	NA	NA
	P15	3,13	100,00	89,50	Positivo	(1) CD105 ⁺	Negativo
A2	P3	0,47	52,39	42,00	NA	(2) CD105 ⁺ /CD105 ^{+/+}	NA
	P9	3,06	95,23	88,00	NA	(2) CD105 ⁺ /CD105 ^{+/+}	NA
	P13	NA	NA	NA	Positivo	(3) CD105 ⁻	Positivo*
A3	P3	2,71	9,53	6,00	NA	(2) CD105 ⁺ /CD105 ⁻	NA
	P9	6,78	71,43	72,00	NA	(3) CD105 ⁻	NA
	P10	NA	NA	NA	NR	(3) CD105 ⁻	Positivo
A4	P3	0,68	35,30	5,50	NA	NA	NA
	P9	1,41	NC	70,50	NA	NA	NA
	P15	2,87	95,24	96,00	Positivo	(1) CD105 ⁺	Negativo
A5	P3	0,85	40,00	26,50	NA	NA	NA
	P9	1,28	NC	97,50	NA	NA	NA
	P15	1,89	100,00	98,00	Positivo	(2) CD105 ⁺ /CD105 ⁻	Negativo
A6	P3	1,43	23,53	16,00	NA	NA	NA
	P9	0,82	47,06	43,00	NA	NA	NA
	P15	3,56	76,20	75,00	Positivo	(2) CD105 ⁺ /CD105 ^{+/+}	Negativo
A7	P3	0,20	9,53	6,00	NA	NA	NA
	P9	0,45	90,00	77,00	NA	NA	NA
	P15	1,61	80,96	77,50	Positivo	(2) CD105 ⁺ /CD105 ^{+/+}	Negativo
A8	P3	0,82	12,50	9,00	NA	NA	NA
	P9	1,20	100,00	91,50	NA	NA	NA
	P15	1,77	100,00	98,00	Positivo	(1) CD105 ⁺⁺	Negativo
A9	P3	0,56	14,29	11,00	NA	NA	NA
	P9	2,04	100,00	95,50	NA	NA	NA
	P15	2,22	100,00	91,50	Positivo	(1) CD105 ^{+/++}	Negativo
A10	P3	1,57	14,29	12,00	NA	NA	NA
	P9	1,53	100,00	95,50	NA	NA	NA
	P15	1,32	100,00	93,00	Positivo	(2) CD105 ^{+/+}	Negativo

LEGENDA: NA – NÃO SE APLICA À METODOLOGIA UTILIZADA; NC – NÃO CONCLUSIVO; NR – NÃO REALIZADO; *EXIBIU TAMBÉM CRESCIMENTO SOB A FORMA ASCÍTICA.

Fonte: O autor (2013).

TABELA 7 – VALORES DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS PAPANICOLAOU, CARIOTIPAGEM E FISH EM P3, P9 E P15 PELO TESTE DE PEARSON, PARA VALORES DE $\alpha=0,05$ E $\alpha=0,01$.

Passagem	Métodos	Banda G	FISH
P3	Papanicolaou	-0,328 (p=0,355)	-0,234 (p=0,514)
	Banda G		0,825 (p=0,003)*
P9	Papanicolaou	0,068 (p=0,873)	0,125 (p=0,730)
	Banda G		0,963 (p=0,023)**
P15	Papanicolaou	-0,360 (p=0,381)	-0,357 (p=0,037)*
	Banda G		0,914 (p=0,001)*

LEGENDA: *VALOR SIGNIFICATIVO PARA $\alpha=0,01$; **VALOR SIGNIFICATIVO PARA $\alpha=0,05$.

TABELA 8 – VALORES DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS PAPANICOLAOU, CARIOTIPAGEM E FISH EM P3, P9 E P15, COM OS RESULTADOS DAS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM E TUMORIGÊNESE *IN VIVO* EM P15, PELO TESTE DE WILCOXON (Z), PARA VALORES DE $\alpha=0,05$ E $\alpha=0,01$; E ENTRE IMUNOFENOTIPAGEM E TUMORIGÊNESE *IN VIVO*, EM P15, PELO TESTE QUI-QUADRADO (χ^2).

Método	Passagem	Imunofenotipagem	Tumorigênese
Papanicolaou	P3	-1,866 (p=0,0614)	-3,138 (p=0,0016)*
	P9	-2,414 (p=0,0159)**	-3,621 (p=0,0003)*
	P15 ^a	-3,266 (p=0,0010)*	-3,919 (p=0,0539)
Banda G	P3	-3,723 (p=0,0002)*	-3,723 (p=0,0002)*
	P9 ^b		
	P15 ^c		
FISH	P3	-3,059 (p=0,0022)*	-3,059 (p=0,0022)*
	P9	-3,407 (p=0,0006)*	-3,407 (p=0,0006)*
	P15 ^c		
Citometria			(χ^2) 3,333 (p=0,9496)

*VALOR SIGNIFICATIVO PARA $\alpha=0,01$; **VALOR SIGNIFICATIVO PARA $\alpha=0,05$; ^aVALORES ESTIMADOS PARA AS AMOSTRAS A2 E A3 OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR; ^bNÃO PASSÍVEL DE CÁLCULO DEVIDO À ANÁLISE INCONCLUSIVA DAS AMOSTRAS A4 E A5; ^cNÃO PASSÍVEL DE CÁLCULO DEVIDO ÀS AMOSTRAS A2 E A3 NÃO TEREM SIDO CULTIVADAS ATÉ ESTA PASSAGEM.

Os resultados obtidos por meio da técnica de Papanicolaou, nas três passagens de análise, exibiram forte correlação com os resultados das técnicas de Imunofenotipagem e/ou Tumorigênese. Em P3 foi observada correlação significativa com a Tumorigênese ($p=0,0016$) e em P9, com a imunofenotipagem ($p=0,0159$) e tumorigênese ($p=0,0003$). Em P15, considerando os valores estimados para as amostras A2 e A3, obteve-se novamente correlação significativa com a imunofenotipagem ($p=0,0010$), sendo o valor correspondente à correlação com a tumorigênese $p=0,0539$ (TABELA 7).

As técnicas de cariotipagem e FISH exibiram valores significativos de correlação em todas as passagens, sendo 0,825 ($p=0,003$) em P3, 0,963 ($p=0,023$) em P9 e 0,914 ($p=0,001$) em P15 (TABELA 7). Os resultados obtidos na técnica de cariotipagem em P3 exibiram correlação significativa também com os das técnicas de imunofenotipagem e tumorigênese ($p=0,0002$, TABELA 8). Não foi possível estimar as correlações dos resultados da técnica de cariotipagem em P9 e P15. Em P9 em razão do cariótipo inconclusivo das amostras A4 e A5 e, em P15, devido ao fato de não se ter o cariótipo das amostras A2 e A3.

Foi observada estreita correlação entre os resultados das técnicas de cariotipagem e FISH, tanto em razão do tipo de alteração identificado por meio destas técnicas (GRIMES et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; BARKHOLT et al., 2013) quanto pela elevada frequência de alterações identificadas mesmo por meio da cariotipagem.

A técnica de FISH também exibiu correlação dos resultados em P3 e P9 com os das técnicas de imunofenotipagem e tumorigênese, com valores de $p=0,0022$ em P3 e $p=0,0006$ em P9 para ambas as técnicas. Também a análise dos resultados obtidos por meio das técnicas de imunofenotipagem e tumorigênese demonstrou forte dependência recíproca ($p=0,9210$, TABELA 8).

Não foi observada correlação entre os resultados das técnicas de Papanicolaou e Cariotipagem em nenhuma das passagens avaliadas; e apenas os resultados das técnicas de Papanicolaou e FISH em P15 apresentaram valor significativo ($p=0,037$) para a não correlação (TABELA 7).

7 DISCUSSÃO

7.1 CULTIVO DAS AMOSTRAS DE CTMAs

As células cultivadas de todas as amostras exibiram aspecto morfológico fibroblastóide e padrão de crescimento nos frascos de cultivo compatíveis com a caracterização literária de CTMAs obtidas a partir de *Mus musculus* (YAMAMOTO *et al.*, 2007; SUNG *et al.*, 2008; MIZUNO, 2009; TAHA, HEDAYATI, 2010). Este perfil foi mantido em todas as amostras entre P1 e P9 e em oito das dez amostras (A1, A4-A10) até P15.

Diferentemente do relatado na maioria dos trabalhos porém, foi observada modificação no perfil proliferativo das CTMAs durante o cultivo. Esta modificação foi evidenciada pela redução do tempo médio de duplicação e antecipação do período de crescimento exponencial entre as passagens P3 e P15, justificando a redução observada no tempo médio de cultivo entre as passagens a partir de P5.

Esta redução seria resultante da seleção de células com maior capacidade proliferativa nas primeiras passagens, como já evidenciado em trabalhos com diferentes CTM (MIURA *et al.*, 2006; TOLAR *et al.*, 2007; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008; MOHSENY *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2012).

Duas amostras, A2 e A3, apresentaram modificações morfológicas no cultivo e alteração mais significativa do perfil proliferativo, com período de crescimento exponencial prolongado e abundância de células com formato globular, não aderentes e viáveis. Em especial na amostra A3, essas células substituíram na quase totalidade as células aderentes e mantiveram elevado potencial proliferativo, similar ao das células do tumor de Ehrlich. Tais achados levaram à hipótese da ocorrência de transformação espontânea nessas amostras, como já relatado para cultivos de outras CTMs de camundongos, como CTMOs (ZHOU *et al.*, 2006; TOLAR *et al.*, 2007; MOHSENY *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012) e CTM derivadas da retina (DJOJOSUBROTO *et al.*, 2009).

7.2 ALGORITMO DE ANÁLISE

Recentemente, Irioda *et al.* (2011) propuseram um algoritmo para a padronização da triagem dos cultivos de CTM, visando avaliar a segurança do uso destes em transplantes. Neste algoritmo foram combinadas as técnicas de Papanicolaou, imunofenotipagem por citometria de fluxo, FISH, cariotipagem e a avaliação *in vivo* do potencial tumorigênico.

Com o intuito de avaliar a eficiência da combinação de tais técnicas na triagem de cultivos de CTMAs, paralelamente aos procedimentos usuais para o acompanhamento do cultivo das amostras e avaliação cinética, alíquotas de cada amostra foram avaliadas nas passagens P3, P9 e P15. A seleção destas passagens possibilitou comparar períodos de cultivo caracterizados consensualmente como de curta (P3) e de longa duração (P15) (LIU *et al.*, 2006; BOCHKOV *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007b; IZADPANAHI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012); além de um período intermediário (P9), para o qual a definição como de curta ou longa duração pode exibir divergência (BOCHKOV *et al.*, 2008; MEZA-ZEPEDA *et al.*, 2008; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009).

7.2.1 Papanicolaou

O teste de Papanicolaou não é aplicado habitualmente na avaliação de CTM cultivadas. Irioda *et al.* (2011) foram os primeiros a relatar este tipo de aplicação da técnica, incluindo-a como a primeira no algoritmo proposto. Na mesma publicação, os autores também relataram a detecção de alterações em CTMAs humanas.

Em seu escopo original, a técnica de Papanicolaou é uma ferramenta com ótima relação custo-benefício utilizada na prevenção e diagnóstico do câncer de colo de útero tendo, por isso, sido incluída na triagem rotineira da população feminina adulta em diferentes países (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Sua eficiência e especificidade são alvos frequentes de avaliação por meio de diferentes metodologias.

Avaliações baseadas na repetição do teste, como o de Soost *et al.* (1991) por exemplo, estimaram a sensibilidade e especificidade global dessa técnica em $\cong 80\%$ e $\cong 99,4\%$, respectivamente. Estudos utilizando limiares de detecção, como o de Nanda *et al.* (2003), apesar de identificarem maior variação nos resultados, também

obtiveram estimativa elevada tanto para sensibilidade ($\cong 70-80\%$) quanto para a especificidade ($\cong 95\%$).

Especificamente na triagem populacional para prevenção do câncer de colo uterino, estudos mais recentes têm revelado maior eficiência de outras técnicas diagnósticas em relação ao teste de Papanicolaou (KARIMI-ZARCHI *et al.*, 2013; WILLIS, HYDE, 2014), contudo, corroborando o proposto por Irioda *et al.* (2011), consideramos que esta técnica pode contribuir significativamente na avaliação de CTM e outras células aderentes em cultivos para terapias, tanto em razão da sua sensibilidade/especificidade quanto pela facilidade de execução.

No presente estudo, as alterações identificadas foram agrupadas em duas categorias: (1) multinucleação; e (2) morfologia de núcleo. Ambas as alterações são, no escopo original de uso da técnica, importantes indicadores. A multinucleação em células da cérvice uterina indicam a existência de lesões intra-epiteliais de baixo grau; enquanto modificações morfológicas nucleares sugerem a possibilidade da existência de lesões intra-epiteliais de alto grau (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; APGAR *et al.*, 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013).

As alterações identificadas se mostraram predominantes nas amostras com perfil proliferativo modificado. Enquanto a amostra A3 apresentou as maiores frequências de alteração em P3 e P9, a amostra A2 exibiu o maior aumento na frequência de alterações (P3→P9) entre as amostras e passagens. Estes achados, combinados aos parâmetros morfológicos e perfil proliferativo durante o cultivo, corroboraram a hipótese de transformação dessas amostras.

7.2.2 Citogenética

Também na análise citogenética foram detectadas alterações em todas as amostras e passagens, tanto por cariotipagem quanto por FISH. À exemplo das alterações detectadas por Papanicolaou, também foi observada tendência de aumento na proporção de células com alterações, acompanhando o avanço das passagens, em especial entre P3 e P9.

7.2.2.1 Cariotipagem

As alterações identificadas no cariótipo das amostras foram principalmente numéricas, com tendência de aumento do número de células com cariótipo anormal e também do número médio de cromossomos por metáfase, sobretudo entre P3 e P9.

A identificação de alterações cromossômicas numéricas tem sido relatada com relativa frequência em cultivos de CTM de diferentes organismos, de camundongos (TOLAR *et al.*, 2007; DOJOSUBROTO *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2011) a coelhos (AHMADBEIGI *et al.*, 2011) e mesmo humanos (TARTE *et al.*, 2010; ESTRADA *et al.*, 2013; FROELICH *et al.*, 2013); tanto em cultivos de curta (TOLAR *et al.*, 2007; DJOSUBROTO *et al.*, 2009; TARTE *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2011), quanto de longa duração (DJOSUBROTO *et al.*, 2009; BELLOTTI *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo exibiram concordância com outros trabalhos, nos quais também foi observado aumento na frequência de cariótipo anormal (MIURA *et al.*, 2006; FROELICH *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013), e no número de cromossomos por célula com o avanço do cultivo (JOSSE *et al.*, 2010; AHMADBEIGI *et al.*, 2011; ESTRADA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013).

Contudo, a frequência de alterações identificadas no presente estudo foi significativamente maior que a relatada por estes autores, com exceção apenas ao relatado por Josse *et al.* (2010) e Jeong *et al.* (2011).

Alterações cromossômicas estruturais foram identificadas apenas em P9 e P15 e consistiram em amplificações extracromossômicas, as quais podem ser caracterizadas como fragmentos de cromatina acêntricos. Estas alterações são habitualmente encontradas em células tumorais (SHIMIZU, 2011). Também para este tipo de alteração foi observada tendência de aumento durante o cultivo.

A presença destas amplificações em cultivos de CTM com maior duração também encontra respaldo na literatura. Miura *et al.* (2006) descreveram a detecção desse tipo de alteração em cultivos de longa duração de CTMO de camundongos. No estudo de Miura *et al.* (2006), as amplificações cromossômicas se apresentaram em número maior que o identificado no presente estudo, e continham cópias do gene *c-myc*, exibindo portanto, elevado potencial tumorigênico.

Mesmo não tendo sido possível concluir sobre o cariótipo das amostras A4 e A5 em P9, em razão do baixo número de metáfases obtido, essas também exibiram tendência de aumento de metáfases anormais, evidenciado pela proporção de metáfases com alterações cromossômicas em P3 e P15.

7.2.2.2 FISH

A técnica de FISH permite complementar a análise citogenética de CTMs, em especial quanto à sensibilidade na detecção de alterações cromossômicas numéricas, como já demonstrado em outros trabalhos com CTMs (BOCHKOV *et al.*, 2007; GRIMES *et al.*, 2009; ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013).

Bochkov *et al.* (2007) e Grimes *et al.* (2009) relataram a detecção de alterações crípticas à cariotipagem por bandamento G em cultivos de CTMAs humanas. Outros trabalhos, como os de Bochkov *et al.* (2008) e Buyanovskaya *et al.* (2009), utilizaram apenas esta técnica para avaliar CTMs humanas e também identificaram a ocorrência de alterações cromossômicas numéricas.

Nestes estudos com CTMs humanas porém, a frequência de alterações identificadas foi significativamente menor que as relatadas no presente estudo em CTMAs de camundongos. O mesmo ocorrendo em relação a trabalhos que descrevem transformação espontânea de CTMs de camundongos como Miura *et al.* (2006) e Djojsoebruto *et al.* (2009).

7.2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A caracterização imunofenotípica de CTMs inclui habitualmente a expressão dos marcadores CD73, CD90 e CD105; e a ausência da expressão dos marcadores CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e complexo maior de histocompatibilidade classe II, principalmente HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006; BARKHOLT *et al.*, 2013).

Em camundongos, a caracterização de CTMs também é realizada habitualmente por meio da avaliação do perfil de expressão desses mesmos marcadores, em especial de CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2007; SUNG *et al.*, 2008; STRIOGA *et al.*, 2012; PAZDRO, HARRISON, 2013). Contudo, o registro literário da expressão desses e outros marcadores em CTMAs de camundongos contém relatos divergentes.

Pazdro e Harrison (2013) avaliaram CTMAs de três linhagens de camundongos quanto à expressão dos marcadores CD44, CD90 e CD105 e identificaram diferenças significativas quanto à expressão de CD44 e CD105. CTMAs das linhagens C57BL/6J e BALB/cByJ apresentaram menor expressão de CD44 e maior de CD105 que as CTMAs da linhagem DBA/2J. Garrovo *et al.* (2013) por sua

vez, identificaram para a mesma linhagem C57BL/6J, níveis muito baixos de expressão de CD105 e expressão maior do marcador CD90.

Variações na expressão de marcadores na mesma amostra também já foram descritas. Maddox *et al.* (2009) relataram a ocorrência de alteração na expressão dos marcadores CD73 e CD146 entre passagens dos mesmos cultivos de CTMAs (P3→P10). Em P3 ambos os marcadores apresentaram baixa expressão, aumentando significativamente até P10. Já os marcadores CD90.2 e CD105, exibiram baixa e alta expressão, respectivamente, no mesmo período de avaliação.

Adicionalmente, a existência em camundongos de duas variantes ortólogas para o marcador CD90 humano, CD90.1 e CD90.2, pode responder por parte das divergências nos relatos sobre a expressão de “CD90” em camundongos. CD90.1 e CD90.2 diferem entre si em apenas um aminoácido, na posição 108 (glutamina→arginina, CD90.2→D90.1) e na maioria das linhagens, é identificada a expressão do marcador CD90.2 (REGE, HAGOOD, 2006).

A caracterização literária da expressão do marcador “CD90” em CTMs de camundongos inclui tanto trabalhos nos quais foram utilizados anticorpos anti-CD90.1 (LIU *et al.*, 2010), anti-CD90.2 (MADDOX *et al.*, 2009; JOSSE *et al.*, 2010; PAZDRO, HARRISON, 2013) e também trabalhos nos quais não foi discriminado o anticorpo utilizado (MIURA *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2007; GARROVO *et al.*, 2013), dificultando a comparação dos resultados.

Não foram identificados trabalhos com a caracterização da expressão de “CD90” em CTMAs de camundongos da linhagem Swiss. Assim, o perfil negativo identificado para este marcador nas amostras avaliadas no presente estudo pode decorrer do uso do anticorpo anti-CD90.1.

O marcador cuja expressão exibiu variação significativa entre as amostras, com tendência de redução durante o cultivo, foi o CD105. O posicionamento da ISCT inclui a expressão desse marcador como um dos critérios para a caracterização das CTM humanas (DOMINICI *et al.*, 2006; BARKHOLT *et al.*, 2013) e é corroborado por relatos em CTM de camundongos, nos quais sua expressão não exibiu diferença significativa entre linhagens de animais ou períodos de cultivo (YAMAMOTO *et al.*, 2007; SUNG *et al.*, 2008; MADDOX *et al.*, 2009).

Contudo, há também um grande número de trabalhos relatando a ocorrência de variação na expressão de CD105, tanto entre diferentes linhagens de animais e amostras, quanto em uma mesma amostra (FIORINA *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2009;

JIANG *et al.*, 2010; ROSU-MYLES *et al.*, 2010; LEVI *et al.*, 2011; CAPRA *et al.*, 2012; DIVYA *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2013; GARROVO *et al.*, 2013; LEYVA-LEYVA *et al.*, 2013).

Entre os relatos encontram-se diferenças no nível de expressão entre CTMOs de linhagens de camundongos (FIORINA *et al.*, 2009); entre amostras de CTMs derivadas do cordão umbilical (JIN *et al.*, 2009; DIVYA *et al.*, 2012) e membrana amniótica (LEYVA-LEYVA *et al.*, 2013) de diferentes doadores; entre frações celulares das mesmas amostras de CTMAs (JIANG *et al.*, 2010; LEVI *et al.*, 2011; ANDERSON *et al.*, 2013) ou mesmo entre diferentes períodos de cultivo da mesma amostra (CAPRA *et al.*, 2012; GARROVO *et al.*, 2013).

Em alguns relatos a divergência identificada na expressão do marcador CD105 apresentou correlação com diferenças observadas no potencial de diferenciação. Jiang *et al.* (2010) relataram que CTMAs humanas CD105⁻ exibiram maior potencial adipogênico e menores potenciais osteogênico e condrogênico que CTMAs CD105⁺.

Para o potencial adipogênico, o mesmo foi descrito por Anderson *et al.* (2013) em CTMAs de camundongos, contudo, para estes autores, o potencial osteogênico observado foi maior nas CTMAs CD105⁻ que nas CD105⁺. Levi *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes aos de Anderson *et al.* (2013) em CTMAs humanas, mas caracterizaram a expressão de CD105 como baixa e não negativa.

A redução na expressão do marcador CD105 identificada ao longo do cultivo de CTMAs no presente estudo corrobora os achados de Capra *et al.* (2012), para CTMAs humanas; e por Rosu-Myles *et al.* (2010) e Garrovo *et al.* (2013), em CTMAs de camundongos. Contudo, Capra *et al.* (2012) e Garrovo *et al.* (2013) não identificaram correlação entre a redução dos níveis de expressão desse marcador com a ocorrência de outras alterações ou do potencial de diferenciação. Já Rosu-Myles *et al.* (2010) sugeriram que a redução observada reflete a substituição das CTMAs em cultivo por células progenitoras.

No presente estudo, a redução significativa na expressão do marcador CD105 identificada nas amostras A2 e A3, associada ao maior volume de alterações detectadas por meio das técnicas Papanicolaou e citogenética, reforçaram a hipótese de transformação das mesmas e indicaram a possibilidade desse marcador constituir-se em indicador da transformação celular e/ou constituir-se de biomarcador chave deste processo.

7.2.4 Diferenciação celular *in vitro*

A manutenção do potencial de diferenciação das CTM sob cultivo é condição *sine qua non* para a obtenção do efeito terapêutico desejado (HWANG *et al.*, 2008; STRIOGA *et al.*, 2012). Assim, mesmo não compondo o fluxograma proposto para a triagem dos cultivos dessas células, é apenas por meio da indução da diferenciação que sua pluripotencialidade pode ser atestada.

A Sociedade Internacional para a Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT), após empreender esforços na uniformização da denominação para as CTM (HORWITZ *et al.*, 2005), indicou entre os critérios mínimos para a demonstração da pluripotencialidade das CTMs, a indução da sua diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006).

O registro literário sobre CTMs no entanto, contém grande diversidade de relatos de diferenciação (OSWALD *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; DEZAWA *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2005; KUO, TUAN, 2008; KRAMPERA *et al.*, 2007; PĂUNESCU *et al.*, 2007). Nestes relatos, mesmo quando restrito às CTMAs, incluem tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários (JEON *et al.*, 2006; TIMPER *et al.*, 2006; ANGHILERI *et al.*, 2008; AURICH *et al.*, 2009; BLANDE *et al.*, 2009).

No presente estudo, todas as amostras que mantiveram padrão fibroblastóide de crescimento até P15, bem como a amostra A2 em P13, foram induzidas à diferenciação celular *in vitro* para as linhagens adipogênica e osteogênica. A coloração diferencial permitiu a detecção dos depósitos lipídicos citoplasmáticos típicos da diferenciação adipogênica, bem como dos depósitos extracelulares de cristais de cálcio, típicos da diferenciação osteogênica, em todas as amostras submetidas à diferenciação.

7.2.5 Tumorigênese *in vivo*

A formação de tumores a partir de CTMs cultivadas já foram relatados em diferentes trabalhos, tanto em estudos com foco na eficiência terapêutica quanto na segurança do transplante (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002; STRAUER *et al.*, 2002; BROFMAN *et al.*, 2004; COWAN *et al.*, 2004; GUARITA-SOUZA *et al.*, 2004; 2005; LIU *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007a; WAN *et al.*, 2008; AURICH

et al., 2009; CHO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009; RYU *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012; GARROVO *et al.*, 2013).

No presente estudo, as duas amostras que exibiram divergência das demais quanto aos parâmetros de acompanhamento do cultivo celular, de análise por meio das técnicas de Papanicolaou, citogenética e imunofenotipagem por citometria de fluxo em relação ao marcador CD105, resultaram no crescimento de uma massa celular subcutânea local, detectável já à primeira palpação, cinco dias após a inoculação.

7.3 TRANSFORMAÇÃO CELULAR

A ocorrência de transformação espontânea em cultivos de CTs não constitui fato raro na literatura. Diversos relatos demonstram sua ocorrência em diferentes cultivos de CTs, de CTEs (PRZYBORSKI, 2005; BAKER *et al.*, 2007; TOLAR *et al.*, 2007; BLUM, BENVENISTY, 2008; YANG *et al.*, 2008; STACHELSCHIED *et al.*, 2013) a CTMs (ZHOU *et al.*, 2006; TOLAR *et al.*, 2007; DJOJOSUBROTO *et al.*, 2009; MOHSENY *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012), essencialmente em modelos animais.

Os poucos relatos da ocorrência de transformação em CTMs humanas (RUBIO *et al.*, 2005; RØSLAND *et al.*, 2009) foram retratados posteriormente, sob a alegação de contaminação das amostras (DE LA FUENTE *et al.*, 2010; TORSVIK *et al.*, 2010, respectivamente). Neste contexto, o posicionamento predominante é o de que a transformação em cultivos de CTs humanas, sobretudo de CTMs, é menos provável que em cultivos de CTs de modelos animais (AGUILAR *et al.*, 2007; BERNARDO *et al.*, 2007b; FORONI *et al.*, 2007; VILALTA *et al.*, 2008; AVANZINI *et al.*, 2009; POLONI *et al.*, 2011; STRIOGA *et al.*, 2012; BARKHOLT *et al.*, 2013).

7.3.1 Transformação celular e alterações cromossômicas

Invariavelmente, as amostras de CTs que originam tumores *in vivo* exibem um diversificado conjunto de alterações durante seus cultivos. Independentemente da espécie e tipo celular, o espectro destas alterações incluem desde a amplificação ou deleção de *loci*, mudanças no padrão de metilação, na estrutura e/ou número de

cromossomos; até alterações fenotípicas, envolvendo a expressão de enzimas e/ou CDs, o perfil proliferativo, o potencial de diferenciação e/ou mesmo sua morfologia (SIMONSEN *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2003; MAITRA *et al.*, 2005; MOORE, CAMPBELL, 2005; SHAHDADFAR *et al.*, 2005; IMREH *et al.*, 2006; BOCHKOV *et al.*, 2007; TOLAR *et al.*, 2007; BOCHKOV *et al.*, 2008; CATALINA *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2008; IZADPANAH *et al.*, 2008; TONTI, MANNELLO, 2008; BLUM, BENVENISTY, 2009; BUYANOVSKAYA *et al.*, 2009; GRIMES *et al.*, 2009; RØSLAND *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2010; TARTE *et al.*, 2010; BEN-DAVID *et al.*, 2011; IRIODA *et al.*, 2011; BEN-DAVID *et al.*, 2012; DUAİLİBI *et al.*, 2012; HARRISON, 2012; UEYAMA *et al.*, 2012; BENTIVEGNA *et al.*, 2013; BORGHESI *et al.*, 2013; MANDEL *et al.*, 2013; ROEMELING-VAN *et al.*, 2013).

Dentre as alterações destacam-se habitualmente aquelas envolvendo o número e/ou a estrutura dos cromossomos (TOLAR *et al.*, 2007; DJOJOSUBROTO *et al.*, 2009; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2011). Sua presença no entanto, pode não se mostrar determinante da transformação. Tarte *et al.* (2010), Roemeling-van Rhijn *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2013), por exemplo, relataram a identificação de diferentes alterações cromossômicas em cultivos de CTMs, as quais não induziram a formação de tumores quando testadas *in vivo*.

A correlação entre alterações cromossômicas, especialmente as numéricas, e a formação de tumores não é suficientemente compreendida, coexistindo tanto a defesa de que essas são subprodutos da transformação celular quanto a de que são seus fatores causais (FANG, ZHANG, 2011). Diferentes relatos a partir de modelos celulares distintos, tais como micro-organismos (TORRES *et al.*, 2007) e células animais (WILLIAMS *et al.*, 2008), corroboram tanto um como outro posicionamento.

No entanto, independentemente da existência ou não de consenso quanto à esta questão, é incontestável o fato de que aneuploidias são detectadas na maioria dos tumores humanos (HANAHAN, WEINBERG, 2011) e, comparativamente aos demais tipos de alterações possíveis no material genético, as aneuploidias são as que exibem maior efeito potencial sobre a fisiologia celular, pois resultam em uma dosagem anormal de muitos genes simultaneamente (FANG, ZHANG, 2011).

No presente estudo, alterações cromossômicas numéricas foram detectadas em todas as amostras, das quais apenas duas, A2 e A3 se mostraram tumorais. Contudo, a proporção de células com cariótipo alterado nas amostras exibiu forte

correlação com a formação de tumor, tanto para os valores observados em P3 por Cariotipagem e FISH, quanto em P9 por FISH.

7.3.2 Transformação celular e variação do perfil de expressão de CD105

A ocorrência de variação na expressão do marcador CD105 entre amostras e/ou períodos de cultivo de CTMs tem sido descrita em um volume crescente de trabalhos nos últimos anos sem, contudo, que se tenha identificado correlação com outras alterações no cultivo (YAMAMOTO *et al.*, 2007; FIORINA *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; ROSU-MYLES *et al.*, 2010; LEVI *et al.*, 2011; CAPRA *et al.*, 2012; DIVYA *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2013; GARROVO *et al.*, 2013; LEYVA-LEYVA *et al.*, 2013).

CD105 é a designação de uma glicoproteína transmembrana do tipo I denominada endogлина. Esta pode ser encontrada sob três isoformas, longa (L), curta (C) e solúvel (sE). Destas, a isoforma L é a mais abundante e melhor caracterizada. A isoforma L constitui um co-receptor para integrantes da superfamília de proteínas denominadas fatores beta de transformação do crescimento (*transforming growth factor beta*, TGF- β) (LÓPEZ-NOVOA, BERNABEU, 2010; ANDERSON *et al.*, 2013).

A expressão desta isoforma é alta em células em proliferação e células endoteliais, exibindo forte correlação com o remodelamento vascular e angiogênese em diferentes tecidos, estágios do desenvolvimento e condições fisiológicas (GUERRERO-ESTEO *et al.*, 1999; JONKER, ARTHUR, 2002; CLEMENTE *et al.*, 2006; DOCHERTY *et al.*, 2006; BARRESI *et al.*, 2008), bem como na promoção de adesão e inibição da migração celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002; CONLEY *et al.*, 2004).

Quando no contexto de células tumorais, especialmente nas do endotélio vascular tumoral, descreve-se habitualmente que a modulação da expressão de endogлина tenha relação com a supressão e progressão tumoral. Assim, o aumento da sua expressão resultaria em aumento da capacidade angiogênica do tumor, dando suporte ao seu crescimento (BERNABEU *et al.*, 2009; FONSATTI *et al.*, 2010; LÓPEZ-NOVOA, BERNABEU, 2010).

Em CTMs no entanto, não é claro o significado da expressão ou perda de expressão de CD105, existindo um acúmulo de relatos divergentes. Na maioria das publicações, as diferenças relatadas na expressão de CD105 não exibem correlação

com alterações celulares ou outras características relevantes (FIORINA *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2009; ROSU-MYLES *et al.*, 2010; CAPRA *et al.*, 2012; DIVYA *et al.*, 2012; GARROVO *et al.*, 2013; LEYVA-LEYVA *et al.*, 2013); e em alguns casos, há correlação com o potencial de diferenciação (JIANG *et al.*, 2010; LEVI *et al.*, 2011; ANDERSON *et al.*, 2013).

No presente estudo, não foi observada diferença quanto ao potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica da amostra A2, constituída na quase totalidade por células CD105⁻. Contudo, foram observadas diferenças significativas das amostras A2 e A3 em relação às demais, tanto em relação à ausência de adesão celular (MA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002; CONLEY *et al.*, 2004) quanto ao potencial proliferativo, com prolongado período de crescimento exponencial. Este perfil proliferativo aumentado também foi identificado por Pece-Barbara *et al.* (2005) em células endoteliais CD105⁻ de embriões de camundongos.

Fernandez-Lopez *et al.* (2007) e Thomas *et al.* (2007) identificaram relação entre a expressão de CD105 e a modulação da expressão de mais de uma centena de genes, muitos dos quais envolvidos na proliferação, organização do citoesqueleto, conexões intercelulares e migração celular, além da própria angiogênese.

No nível celular, a caracterização como CD105⁻ pode resultar da inibição da síntese de endogлина, da sua clivagem e/ou ainda, da sua internalização. A ausência de síntese, ao menos no nível transcricional, é contestada. Anderson *et al.* (2013) relataram o aumento da síntese de RNAm correspondente à isoforma L, concomitante à redução da sua expressão em cultivos de CTMAs, bem como a detecção de níveis significativos desse RNAm em amostras CD105⁻. Resultados similares foram obtidos em tumores sólidos por Fonsatti *et al.* (2000).

A clivagem de CD105 é mediada por uma metaloproteinase de membrana (MMP-14) e resulta no aparecimento da isoforma eS (LÓPEZ-NOVOA, 2007; HAWINKELS *et al.*, 2010). O aumento da expressão dessa enzima concomitante ao aumento da confluência e proliferação nos cultivos de CTMAs também já foi relatado (ANDERSON *et al.*, 2013). Curiosamente, Yang *et al.* (2013) reportaram recentemente a aquisição de características de CTCs quando da super expressão de uma outra metaloproteinase de membrana, a MMP-1, em células transformadas.

A internalização da endogлина tem sido identificada em diferentes interações e vias bioquímicas, envolvendo proteínas como ALK-1, ALK-2, ALK-5, beta-arrestina, ERK, MAPK entre outras (TANG *et al.*, 2005; BERNABEU *et al.*, 2007; LEE, BLOBE,

2007; TIAN *et al.*, 2012), apresentando-se como um tema ainda pouco compreendido e que pode exibir desdobramentos, inclusive sobre o potencial de transformação celular (SANTIBANEZ *et al.*, 2010).

Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram a hipótese de que a redução na expressão do marcador CD105, detectável por imunofenotipagem por citometria de fluxo, mantém estreita relação com a transformação celular identificada, servindo como um marcador sensível deste processo nos cultivos celulares.

Somado ao desenvolvimento de tumores *in vivo* após a inoculação das amostras CD105⁻ em animais imunodeficientes, propomos que essa redução na expressão seja um biomarcador da transformação maligna de células em cultivo. Sua identificação poderia auxiliar tanto no prognóstico quanto em novas perspectivas de alvos terapêuticos em tumores de tecidos derivados do mesênquima.

8. CONCLUSÕES

- 8.1 O tempo de duplicação celular nos cultivos de CTMAs foi reduzido entre as passagens P3 e P15 e o período de crescimento exponencial foi antecipado para os primeiros dias do cultivo.
- 8.2 A técnica de Papanicolaou possibilitou a detecção de alterações morfológicas e numéricas de núcleos em todas as amostras e passagens e o aumento significativo destas alterações ao longo do cultivo.
- 8.3 A técnica de cariotipagem (bandamento G) possibilitou a identificação de alterações cromossômicas numéricas em todas as amostras e passagens e aumento significativo na proporção de metáfases alteradas e do número de cromossomos ao longo do cultivo.
- 8.4 As sondas produzidas e utilizadas na técnica de FISH possibilitaram a identificação de alterações do número de cromossomos em todas as amostras, passagens e da tendência do aumento do número de cromossomos ao longo do cultivo.
- 8.5 A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo possibilitou a caracterização das amostras de CTMA e a identificação de variação significativa para a expressão do marcador CD105 entre as amostras e sua tendência de redução da sua expressão ao longo do cultivo.
- 8.6 Todas as amostras submetidas à diferenciação osteogênica e adipogênica exibiram potencial de diferenciação.
- 8.7 Duas de dez amostras de CTMAs cultivadas apresentaram transformação espontânea, induzindo a formação de tumor quando testadas *in vivo*.
- 8.8 Os resultados obtidos na técnica de Papanicolaou em P3 e P9 exibiram forte correlação com os resultados do teste de Tumorigênese *in vivo*; e correlação em P9 com os resultados da Imunofenotipagem por citometria de fluxo.
- 8.9 Os resultados obtidos por bandamento G exibiram forte correlação com os resultados da técnica de FISH em todas as passagens.

- 8.10 Os resultados obtidos por bandamento G em P3 exibiram forte correlação com os resultados do teste de tumorigênese *in vivo* e Imunofenotipagem por citometria de fluxo.
- 8.11 Os resultados obtidos na técnica de FISH em P3 exibiu forte correlação com os resultados do teste de tumorigênese *in vivo* e Imunofenotipagem por citometria de fluxo.
- 8.12 Os resultados obtidos nas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e tumorigênese *in vivo* exibiram forte dependência entre si.
- 8.13 CTMAs tendem a acumular alterações ao longo do cultivo, as quais podem ser detectadas por meio de diferentes métodos de análise.
- 8.14 Todas as técnicas utilizadas permitiram identificar alterações que exibiram correlação com a transformação celular.
- 8.15 A técnica de Papanicolaou se destacou no nosso estudo em razão da facilidade de aplicação e alta correlação das alterações detectadas com a transformação.
- 8.16 A correlação dos resultados das técnicas de cariotipagem/bandamento G e FISH, ressaltaram a importância da aplicação da FISH quando não forem detectadas alterações por cariotipagem.
- 8.17 A perda de expressão do marcador CD105 em cultivos de CTMAs é um bioindicador importante da transformação celular.
- 8.18 A manutenção do potencial de diferenciação *in vitro* não é determinante da segurança da aplicação terapêutica de uma dada amostra de CTMA.
- 8.19 O algoritmo proposto para a triagem de cultivos de CTMAs mostrou eficiência em correlacionar as alterações detectadas à ocorrência de transformação e poderá contribuir com o estabelecimento de uma escala de segurança para a aplicação terapêutica de CTMAs cultivadas.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A técnica de Papanicolaou, quando utilizada na análise de células descamadas da cérvix uterina, possibilita também a detecção de outras alterações, cujo arranjo pode caracterizar tipos distintos de lesões (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; APGAR *et al.*, 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013). No presente estudo decidiu-se pela inclusão apenas das alterações do número e de morfologia dos núcleos. Esta decisão decorreu do fato de ainda não haver padronização do uso dessa técnica para cultivos de CTMs.

Desta forma, evitou-se incorrer em erros de julgamento, resultantes de eventuais falhas no preparo das amostras ou mesmo devido à não capacitação do avaliador no uso da técnica, haja vista que, mesmo para o uso padronizado da técnica, divergências de julgamento não são incomuns (NANDA *et al.*, 2000; TAVARES *et al.*, 2008; UTAGAWA *et al.*, 2010).

A resolução obtida para os cromossomos de *Mus musculus* se mostrou compatível com o padrão caracterizado entre 350-400 bandas do cariótipo humano, suficiente para a detecção de alterações estruturais da ordem de $\cong 7$ -10 Mb (BICKMORE, 2001; ISCN, 2009).

Assim, eventuais alterações envolvendo regiões cromossômicas ainda menores, podem ter se apresentado crípticas à análise. Por este motivo, não descartamos a possibilidade de ocorrência de outras alterações cromossômicas por nós não identificadas nessas amostras.

A existência de duas variantes ortólogas do marcador “CD90” humano em camundongos, CD90.1 e CD90.2; a expressão mais comum de CD90.2 que CD90.1 em várias linhagens de camundongos; e a opção de uso do anticorpo anti-CD90.1, não nos permite descartar que as amostras testadas eventualmente, possam vir a ser caracterizadas como CD90.2⁺.

Todas as amostras foram testadas *in vivo* em camundongos imunodeficientes. Eventualmente, as amostras que se apresentaram transformadas poderão não exibir a formação de tumores quando inoculadas em animais sem comprometimento imunológico.

Uma das amostras, A3, não foi submetida à diferenciação por não exibir adesão das suas células à superfície do frasco de cultivo. Eventualmente, caso seja utilizada metodologia de fixação dessas células a uma superfície, pode-se julgar com segurança seu potencial de diferenciação.

Ainda sobre diferenciação, não foi aplicada uma metodologia para quantificação do potencial de diferenciação. Assim, foi estabelecido como parâmetro na avaliação a condição categórica de diferenciação ou não das amostras.

9 REFERÊNCIAS

- ACHILLE, V.; MANTELLI, M.; ARRIGO, G.; NOVARA, F.; AVANZINI, M. A.; BERNARDO, M. E.; ZUFFARDI, O.; BAROSI, G.; ZECCA, M.; MACCARIO, R. Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded *in vitro* from healthy donors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 7, p. 1817-1821, 2011.
- AGUILAR, S.; NYE, E.; CHAN, J.; LOEBINGER, M.; SPENCER-DENE, B.; FISK, N.; STAMP, G.; BONNET, D.; JANES, S. M. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p. 1586-1594, 2007.
- AHMADBEIGI, N.; SHAFIEE, A.; SEYEDJAFARI, E.; GHEISARI, Y.; VASSEI, M.; AMANPOUR, S.; AMINI, S.; BAGHERIZADEH, I.; SOLEIMANI, M. Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2011.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.
- ANDERSON, P.; CARRILLO-GÁLVEZ, A. B.; GARCÍA-PÉREZ, A.; COBO, M.; MARTÍN, F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e76979, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076979>>. Acesso em 03/01/2014.
- ANDREWS, P. W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. **The Royal Society**, v. 357, p. 405-417, 2002.
- ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A.; CIFELLI, P.; GALIÉ, M.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BELLUZZI, O.; BONETTI, B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 5, p. 909-916, 2008.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT JR., T. C. The 2001 Bethesda system terminology. **American Family Physician**, v. 68, p. 1992-1998, 2003.
- ASHKENAZI, R.; GENTRY S. N.; JACKSON, T. L. Pathways to tumorigenesis – modeling mutation acquisition in stem cells and their progeny. **Neoplasia**, v. 10, n. 11, p. 1170-1182, 2008.
- AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWASSER, P.; VETTER, M.; WEISE, A.; LIEHR, T.; BRULPORT, M.; HENGSTLER, J. G.; DOLLINGER, M. M.; FLEIG, W. E.; CHRIST, B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo*. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570-581, 2009.
- AVANZINI, M. A.; BERNARDO, M. E.; COMETA, A. M.; PEROTTI, C.; ZAFFARONI, N.; NOVARA, F.; VISAI, L.; MORETTA, A.; DEL FANTE, C.; VILLA, R.; BALL, L. M.; FIBBE, W. E.; MACCARIO, R.; LOCATELLI, F. Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. **Haematologica**, v. 94, n. 12, p. 1649-1660, 2009.
- BAI, X.; YAN, Y.; SONG, Y. H.; SEIDENSTICKER, M.; RABINOVICH, B.; METZELE, R.; BANKSON, J. A.; VYKOUKAL, D.; ALT, E. Both cultured and freshly isolated adipose tissue-derived stem cells enhance cardiac function after acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 31, n. 4, p. 489-501, 2010.
- BAKER, D. E.; HARRISON, N. J.; MALTBY, E.; SMITH, K.; MOORE, H. D.; SHAW, P. J.; HEATH, P. R.; HOLDEN, H.; ANDREWS, P. W. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 207-215, 2007.
- BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; OSAKI, M.; KATO, T.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n. 1, p.

70-77, 2009.

BARKHOLT, L.; FLORY, E.; JEKERLE, V.; LUCAS-SAMUEL, S.; AHNERT, P.; BISSET, L.; BÜSCHER, D.; FIBBE, W.; FOUSSAT, A.; KWA, M.; LANTZ, O.; MAČIULAITIS, R.; PALOMÄKI, T.; SCHNEIDER, C. K.; SENSEBÉ, L.; TACHDJIAN, G.; TARTE, K.; TOSCA, L.; SALMIKANGAS, P. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 753-759, 2013.

BARRESI, V.; GROSSO, M.; VITARELLI, E.; TRIOLO, O.; BARRESI, G. Endoglin (CD105) expression in the human heart throughout gestation: an immunohistochemical study. **Reproductive Sciences**, v. 15, n. 10, p. 1018-1026, 2008.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; McINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.

BASCIANO, L.; NEMOS, C.; FOLIGUET, B.; DE ISLA, N.; DE CARVALHO, M.; TRAN, N.; DALLOUL, A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC Cell Biology**, v. 12, e12, 2011 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073900/>>. Acesso em 10/12/2013.

BASEL, M. F. **ISCN: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature**. Memphis: Karger Publishers, 1995.

BATH, C.; YANG, S.; MUTTUVELU, D.; FINK, T.; EMMERSEN, J.; VORUM, H.; HJORTDAL, J.; ZACHAR, V. Hypoxia is a key regulator of limbal epithelial stem cell growth and differentiation. **Stem Cell Research**, v. 10, n. 3, p. 349-360, 2013.

BELLOTTI, C.; STANCO, D.; RAGAZZINI, S.; ROMAGNOLI, L.; MARTELLA, E.; LAZZATI, S.; MARCHETTI, C.; DONATI, D.; LUCARELLI, E. Analysis of the karyotype of expanded human adipose-derived stem cells for bone reconstruction of the maxillo-facial region. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 26, Suppl., p. 3-9, 2013.

BEN-DAVID, U.; BENVENISTY, M. Analyzing the genomic integrity of stem cells. In: StemBook [Internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133286/>>. Acesso em 11/08/2013.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 2, p. 97-102, 2011.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Significant acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells: response to Sensebé *et al.* **Cells Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 10-11, 2012.

BEN-PORATH, I.; THOMSON, M. W.; CAREY, V. J.; GE, R.; BELL, G. W.; REGEV, A.; WEINBERG, R. A. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 499-507, 2008.

BENTIVEGNA, A.; MILOSO, M.; RIVA, G.; FOUDAH, D.; BUTTA, V.; DALPRÀ, L.; TREDICI, G. DNA Methylation Changes during In Vitro Propagation of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Their Genomic Stability? **Stem Cells International**, e192425, 2013. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833027/>>. Acesso em 16/02/2013.

BERNABEU, C.; CONLEY, B. A.; VARY, C. P. H. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1375-1388, 2007.

BERNABEU, C.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; QUINTANILLA, M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 10, p. 954-973, 2009.

^aBERNARDO, M. E.; AVANZINI, M. A.; PEROTTI, C.; COMETA, A. M.; MORETTA, A.; LENTA, E.; DEL FANTE, C.; NOVARA, F.; DE SILVESTRI, A.; AMENDOLA, G.; ZUFFARDI, O.; MACCARIO, R.; LOCATELLI, F. Optimization of *in vitro* expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 1, p. 121-130, 2007.

BERNARDO, M. E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells. **Annals of New York**

Academy of Science, v. 1176, p. 101-117, 2009.

^bBERNARDO, M. E.; ZAFFARONI, N.; NOVARA, F.; COMETA, A. M.; AVANZINI, M. A.; MORETTA, A.; MONTAGNA, D.; MACCARIO, R.; VILLA, R.; DAIDONE, M. G.; ZUFFARDI, O.; LOCATELLI, F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. **Cancer Research**, v. 67, n.19, p. 9142-9149, 2007.

BERNIAKOVICH, I.; GIORGIO, M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n. 1, p. 2119-2134, 2013.

^bGONZÁLEZ, M. A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BÜSCHER, D.; DELGADO, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 1006-1019, 2009.

BICKMORE, W. A. Karyotype analysis and chromosome banding. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. New York: John Wiley and Sons Ltd., 2001.

BIVALACQUA, T. J.; DENG, W.; KENDIRCI, M.; USTA, M. F.; ROBINSON, C.; TAYLOR, B. K.; MURTHY, S. N.; CHAMPION, H. C.; HELLSTROM, W. J.; KADOWITZ, P. J. Mesenchymal stem cells alone or *ex vivo* gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. 1278-1290, 2007.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; DHUPA, S.; SAMS, A. E.; TAYLOR, R.; HARMAN, S.; GINGERICH, D. A.; HARMAN, R. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. **Veterinary Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 192-200, 2008.

BLANDE, I. S.; BASSANEZE, V.; LAVINI-RAMOS, C.; FAE, K. C.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A. A.; SCHETTER, I. T.; KRIEGER, J. E. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. **Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2680-2685, 2009.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. The tumorigenicity of diploid and aneuploidy human pluripotent cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3822-3830, 2009.

BOCHEV, I.; ELMADJIAN, G.; KYURKCHIEV, D.; TZVETANOV, L.; ALTANKOVA, I.; TIVCHEV, P.; KYURKCHIEV, S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 32, n. 4, p. 384-393, 2008.

BOCHKOV, N. P.; NIKITINA, V. A.; BUYANOVSKAYA, O. A.; VORONINA, E. S.; GOLDSTEIN, D. V.; KULESHOV, N. P.; RZHANINOVA, A. A.; CHAUSHEV, I. N. Aneuploidy of stem cells isolated from human adipose tissue. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 146, n. 3, p. 344-347, 2008.

BOCHKOV, N. P.; NIKITINA, V. A.; VORONINA, E. S.; KULESHOV, N. P. Methodological guidelines for genetic safety testing of cell transplants. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, v. 118, n. 4, p. 677-683, 2009.

BOCHKOV, N. P.; VORONINA, E. S.; KOSYAKOVA, N. V.; LIEHR, T.; RZHANINOVA, A. A.; KATOSOVA, L. D.; PLATONOVA, V. I.; GOL'DSHTEIN, D. V. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 1, p. 122-126, 2007.

BONNAMAIN, V.; THINARD, R.; SERGENT-TANGUY, S.; HUET, P.; BIENVENU, G.; NAVEILHAN, P.; FARGES, J. C.; ALLIOT-LICHT, B. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 357, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858652/>>. Acesso em 10/12/2013.

BORGHESI, A.; AVANZINI, M. A.; NOVARA, F.; MANTELLI, M.; LENTA, E.; ACHILLE, V.; CERBO, R. M.; TZIALLA, C.; LONGO, S.; DE SILVESTRI, A.; ZIMMERMANN, L. J.; MANZONI, P.; ZECCA, M.; SPINILLO, A.; MACCARIO, R.; ZUFFARDI, O.; STRONATI, M. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. **Cytotherapy**, v. 15, n. 11, p. 1362-1373, 2013.

BOVERI, T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. **Journal of Cell Science**, v. 121, Suppl. 1, p. 1-84, 2008.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. Terapia celular. Uma nova perspectiva no tratamento da insuficiência cardíaca de causa isquêmica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 5, p. 357-359, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 150, n. 112, p. 59-62, 13/06/2013. Seção 1, Pt. 1.

BROFMAN, P. R.; CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A. C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 3, n. 19, p. 261-266, 2004.

BURNS, J. S.; ABDALLAH, B. M.; GULDBERG, P.; RYGAARD, J.; SCRODER, H. D.; KASSEM, M. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3126-3135, 2005.

BUYANOVSKAYA, O. A.; KULESHOV, N. P.; NIKITINA, V. A.; VORONINA, E. S.; KATOSOVA, L. D.; BOCHKOV, N. P. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, n. 1, p. 109-112, 2009.

BUZZARD, J. J.; GOUGH, N. M.; CROOK, J. M.; COLMAN, A. Karyotype of human ES cells during extended culture. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 381-382, 2004.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CAPRA, E.; BERETTA, R.; PARAZZI, V.; VIGANÒ, M.; LAZZARI, L.; BALDI, A.; GIORDANO, R. Changes in the proteomic profile of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells during passages. **Proteome Science**, v. 10, n. 1, e46, 2012 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3499380/>>. Acesso em 15/03/2014.

^aCARVALHO, K. A. T.; CURY, C. C.; Oliveira, L.; CATANED, R. I. I.; MALVEZZI, M.; FRANCISCO, J. C.; PACHALOK, A.; OLANDOSKI, M.; FARIA-NETO, J. R.; GUARITA-SOUZA, L. C. Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 3, p. 839-841, 2008.

^bCARVALHO, K. A. T.; OLIVEIRA, L.; MALVEZZI, M.; SIMEONE, B. R.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; GUARITA-SOUZA, L. C. Immunophenotypic expression by flow cytometric analysis of cocultured skeletal muscle and bone marrow mesenchymal stem cells for therapy into myocardium. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 3, p. 842-844, 2008.

^cCARVALHO, K. A. T.; SIMEONI, R. B.; GUARITA-SOUZA, L. C.; FRANCISCO, J. C.; ADELWAHID, E.; MYAGUE, N.; CHACHQUES, J. C.; RIVETTI, L. A.; OLIVEIRA, L.; MALVEZZI, M.; OLANDOSKI, M.; GREMSKI, W. Angiogenesis without functional outcome after mononuclear stem cell transplant in a doxorubicin-induced dilated myocardiopathy murine model. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 31, n. 5, p. 431-438, 2008.

CATALINA, P.; MONTES, R.; LIGERO, G.; SANCHEZ, L.; DE LA CUEVA, T.; BUENO, C.; LEONE, P. E.; MENENDEZ, P. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? **Molecular Cancer**, v. 7, p. 76, 2008.

CHANDRA V, G. S.; PHADNIS, S.; NAIR, P. D.; BHONDE, R. R. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p. 1941-1953, 2009.

CHANG, C.; NIU, D.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; LI, F.; GONG, F. Mesenchymal stroma cells improve hyperglycemia and insulin deficiency in the diabetic porcine pancreatic microenvironment. **Cytotherapy**, v. 10, n. 8, p. 796-805, 2008.

CHEN, G.; YUE, A.; RUAN, Z.; YIN, Y.; WANG, R.; REN, Y.; ZHU, L. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. **Cell and Tissue Banking**, 2014 [Internet]. Disponível em

<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10561-014-9420-6>>. Acesso em 23/02/2014.

CHEN, Y. T.; SUN, C. K.; LIN, Y. C.; CHANG, L. T.; CHEN, Y. L.; TSAI, T. H.; CHUNG, S. Y.; CHUA, S.; KAO, Y. H.; YEN, C. H.; SHAO, P. L.; CHANG, K. C.; LEU, S.; YIP, H. K. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, e51, 2011 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112438/>>. Acesso em 04/05/2013.

CHEN, Z.; ZHAO, T.; XU, Y. The genomic stability of induced pluripotent stem cells. **Protein and Cell**, v. 3, n. 4, p. 271-277, 2012.

CHO, K. S.; PARK, H. K.; PARK, H. Y.; JUNG, J. S.; JEON, S. G.; KIM, Y. K.; ROH, H. J. IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. **Stem Cells**, v. 27, n. 1, p. 259-265, 2009.

CHO, S. K.; BOURDEAU, A.; LETARTE, M.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3635-3642, 2001.

CHOI, E. W.; SHIN, I. S.; PARK, S. Y.; PARK, J. H.; KIM, J. S.; YOON, E. J.; KANG, S. K.; RA, J. C.; HONG, S. H. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 1, p. 243-253, 2012.

CHOUMERIANOU, D. M.; DIMITRIOU, H.; PERDIKOIANNI, C.; MARTIMIANAKI, G.; RIMINUCCI, M.; KALMANTI, M. Study of oncogenic transformation in *ex vivo* expanded mesenchymal cells, from paediatric bone marrow. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 909-922, 2008.

CHRISTENSEN, D. R.; CALDER, P. C.; HOUGHTON, F. D. Effect of oxygen tension on the amino acid utilisation of human embryonic stem cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 237-246, 2014.

CHUNG, D. J.; WONG, A.; HAYASHI, K.; YELLOWLEY, C. E. Effect of hypoxia on generation of neurospheres from adipose tissue-derived canine mesenchymal stromal cells. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 1, p. 123-130, 2014.

CLARKE, M. F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1111-1115, 2006.

CLEMENTE, M.; NÚÑEZ, O.; LORENTE, R.; RINCÓN, D.; MATILLA, A.; SALCEDO, M.; CATALINA, M. V.; RIPOLL, C.; IACONO, O. L.; BAÑARES, R.; CLEMENTE, G.; GARCÍA-MONZÓN, C. Increased intrahepatic and circulating levels of endoglin, a TGF-beta1 co-receptor, in patients with chronic hepatitis C virus infection: relationship to histological and serum markers of hepatic fibrosis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 13, n. 9, p. 625-632, 2006.

CO, C.; VICKARYOUS, M. K.; KOCH, T. G. Membrane culture and reduced oxygen tension enhances cartilage matrix formation from equine cord blood mesenchymal stromal cells *in vitro*. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 3, p. 472-480, 2014.

COECKE, S.; BALLS, M.; BOWE, G.; DAVIS, J.; GSTRAUNTHALER, G.; HARTUNG, T.; HAY, R.; MERTEN, O. W.; PRICE, A.; SCHECHTMAN, L.; STACEY, G.; STOKES, W. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 3, p. 261-287, 2005.

CONLEY, B. A.; KOLEVA, R.; SMITH, J. D.; KACER, D.; ZHANG, D.; BERNABÉU, C.; VARY, C. P. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27440-27449, 2004.

CONSTANTIN, G.; MARCONI, S.; ROSSI, B.; ANGIARI, S.; CALDERAN, L.; ANGHILERI, E.; GINI, B.; BACH, S. D.; MARTINELLO, M.; BIFARI, F.; GALIÉ, M.; TURANO, E.; BUDUI, S.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BONETTI, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. **Stem Cells**, v. 27, n. 10, p. 2624-2635, 2009.

COOK, A.; COWAN, C. **Adipose**. In: StemBook [Internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27053/>>. Acesso em 20/12/2013.

- COTTLER-FOX, M. H.; LAPIDOT, T.; PETIT, I.; KOLLET, O.; DI PERSIO, J. F.; LINK, D.; DEVINE, S. Stem cell mobilization. **Hematology**, v. 2003, n. 1, p. 419-437, 2003.
- COWAN, C. M.; SHI, Y. Y.; AALAMI, O. O.; CHOU, Y. F.; MARI, C.; THOMAS, R.; QUARTO, N.; CONTAG, C. H.; WU, B.; LONGAKER, M. T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 560-567, 2004.
- CRESPO-DIAZ, R.; BEHFAR, A.; BUTLER, W.; PADLEY, D. J.; SARR, M. G.; BARTUNEK, J.; DIETZ, A. B.; TERZIC, A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteosome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 797-811, 2011.
- CRISAN, M.; DEASY, B.; GAVINA, M.; ZHENG, B.; HUARD, J.; LAZZARI, L.; PÉAULT, B. Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. **Methods in Cell Biology**, v. 86, p. 295-309, 2008.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, pt. 11, p. 2204-2213, 2006.
- DAHL, J. A.; DUGGAL, S.; COULSTON, N.; MILLAR, D.; MELKI, J.; SHAHDADFAR, A.; BRINCHMANN, J. E.; COLLAS, P. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 8, p. 1033-1042, 2008.
- DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
- DANOVIZ, M. E.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J. S.; DOS SANTOS-JUNIOR, G. R.; SAINT-CLAIR, D.; BAJGELMAN, M. C.; FAÉ, K. C.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A. A.; KRIEGER, J. E. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 4, p. 661-670, 2011.
- DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; LUYTEN, F. P. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 1, p. 85-95, 2001.
- DE LA FUENTE, R.; BERNAD, A.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTIN, M. C.; CIGUDOSA, J. C. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Research**, v. 70, n. 16, p. 6682, 2010.
- DE VRIES, R. B.; BUMA, P.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; GORDIJN, B. Reducing the number of laboratory animals used in tissue engineering research by restricting the variety of animal models. Articular cartilage tissue engineering as a case study. **Tissue Engineering, Part B: Review**, v. 18, n. 6, p. 427-435, 2012.
- DEMERDASH, Z.; EL BAZ, H.; MAHMOUD, F.; MOHAMED, S.; MAHER, K.; GAAFAR, T.; SHAWKY, S.; HASSAN, M.; ABDELHADY, D.; TAHA, T. Enhancing *ex vivo* expansion of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for clinical applications. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 6, p. 628-636, 2013.
- DEZAWA, M.; ISHIKAWA, H.; ITOKAZU, Y.; YOSHIHARA, T.; HOSHINO, M.; TAKEDA, S.; IDE, C.; NABESHIMA, Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 314-317, 2005.
- DI ROCCO, G.; IACHININOTO, M. G.; TRITARELLI, A.; STRAINO, S.; ZACHEO, A.; GERMANI, A.; CREA, F.; CAPOGROSSI, M. C. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. **Journal of Cell Science**, v. 119, pt. 14, p. 2945-2952, 2006.
- DI SUMMA, P. G.; KINGHAM, P. J.; RAFFOUL, W.; WIBERG, M.; TERENGHI, G.; KALBERMATTEN, D. F. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. **Journal of Plastic, Reconstruction and Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 9, p. 1544-1552, 2010.
- DINGLI, D.; TRAULSEN, A.; MICHOR, F. (A)Symmetric stem cell replication and cancer. **Public**

Library of Science – Computational Biology, v. 3, n. 3, e53, 2007.

DIVYA, M. S.; ROSHIN, G. E.; DIVYA, T. S.; RASHEED, V. A.; SANTHOSHKUMAR, T. R.; ELIZABETH, K. E.; JAMES, J.; PILLAI, R. M. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 3, n. 6, p. 57, 2012 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580487/>>. Acesso em 10/01/2014.

DJOJOSUBROTO, M.; BOLLOTTE, F.; WIRAPATI, P.; RADTKE, F.; STAMENKOVIC, I.; ARSENIJEVIC, Y. Chromosomal number aberrations and transformation in adult mouse retinal stem cells *in vitro*. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 12, p. 5975-5987, 2009.

DOCHERTY, N. G.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; AREVALO, M.; DÜWEL, A.; RODRIGUEZ-PENÑA, A.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; BERNABEU, C.; ELENO, N. Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 21, n. 8, p. 2106-2119, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKO, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B.; NEWELL, D. G. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**. New York: John Wiley and Sons Ltd., 1998.

DUALIBI, M. T.; KULIKOWSKI, L. D.; DUALIBI, S. E.; LIPAY, M. V.; MELARAGNO, M. I.; FERREIRA, L. M.; VACANTI, J. P.; YELICK, P. C. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, n. 1, p. 89-94, 2012.

DUGUEZ, S.; DUDDY, W. J.; GNOCCHI, V.; BOWE, J.; DADGAR, S.; PARTRIDGE, T. A. Atmospheric oxygen tension slows myoblast proliferation via mitochondrial activation. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43853, 2012 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427224/>>. Acesso em 23/11/2013.

EBRAHIMIAN, T. G.; POUZOULET, F.; SQUIBAN, C.; BUARD, V.; ANDRÉ, M.; COUSIN, B.; GOURMELON, P.; BENDERITTER, M.; CASTEILLA, L.; TAMARAT, R. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 29, n. 4, p. 503-510, 2009.

ECKELMAN, W. C.; KILBOURN, M. R.; JOYAL, J. L.; LABIRIS, R.; VALLIANT, J. F. Justifying the number of animals for each experiment. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, n. 3, p. 229-232, 2007.

^aENSEMBL. **D5Mit179** [Internet]. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/marker/key/6162?page=markerDetail&key=6162>>. Acesso em 10/02/2012.

^bENSEMBL. **D5Mit134** [Internet]. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/marker/key/1513?page=markerDetail&key=1513>>. Acesso em 10/02/2012.

^cENSEMBL. **D5Mit34** [Internet]. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/marker/key/3309?page=markerDetail&key=3309>>. Acesso em 10/02/2012.

^dENSEMBL. **Cybb** [Internet]. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:88574>>. Acesso em 10/02/2012.

ESLAMINEJAD, M. B.; ROUHI, L.; ARABNAJAFI, M.; BAHARVAND, H. Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. **Cell Biology International**, v. 33, n. 5, p. 607-616, 2009.

ESTRADA, J. C.; ALBO, C.; BENGURÍA, A.; DOPAZO, A.; LÓPEZ-ROMERO, P.; CARRERA-QUINTANAR, L.; ROCHE, E.; CLEMENTE, E. P.; ENRÍQUEZ, J. A.; BERNAD, A.; SAMPER, E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 5, p. 743-755, 2012.

ESTRADA, J. C.; TORRES, Y.; BENGURÍA, A.; DOPAZO, A.; ROCHE, E.; CARRERA-QUINTANAR,

- L.; PÉREZ, R. A.; ENRÍQUEZ, J. A.; TORRES, R.; RAMÍREZ, J. C.; SAMPER, E.; BERNAD, A. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. **Cell Death and Disease**, v. 27, e691, 2013.
- ETO, H.; SUGA, H.; MATSUMOTO, D.; INOUE, K.; AOI, N.; KATO, H.; ARAKI, J.; YOSHIMURA, K. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 4, p. 1087-1097, 2009.
- FAN, G.; WEN, L.; LI, M.; LI, C.; LUO, B.; WANG, F.; ZHOU, L.; LIU, L. Isolation of mouse mesenchymal stem cells with normal ploidy from bone marrows by reducing oxidative stress in combination with extracellular matrix. **BMC Cell Biology**, v. 12, e30, 2011 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141734/>>. Acesso em 09/10/2013.
- FANG, B.; SONG, Y.; LIAO, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, R. C. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 10, p. 3358-3362, 2007.
- FANG, D.; NGUYEN, T. K.; LEISHEAR, K.; FINKO, R.; KULP, A. N.; HOTZ, S.; VAN BELLE, P. A.; XU, X.; ELDER, D. E.; HERLYN, M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, p. 9328-9337, 2005.
- FANG, X.; ZHANG, P. Aneuploidy and tumorigenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 6, p. 595-601, 2011.
- FERNANDEZ-LOPEZ, A.; GARRIDO-MARTIN, E. M.; SANZ-RODRIGUEZ, F.; PERICACHO, M.; RODRIGUEZ-BARBERO, A.; ELENO, N.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; DÜWELL, A.; VEJA, M. A.; BERNABEU, C.; BOTELLA, L. M. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 13, p. 1515-1533, 2007.
- FERREIRA, R. J. **Estudo citogenético molecular de cromossomos marcadores**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Genética) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- FERREIRA, R. J.; IRIODA, A. C.; CUNHA, R. C.; FRANCISCO, J. C.; GUARITA-SOUZA, L. C.; SRIKANTH, G. V. N.; NITYANAND, S.; ROSATI, R.; CHACHQUES, J. C.; CARVALHO, K. A. T. Controversies about the chromosomal stability of cultivated mesenchymal stem cells: their clinical use is it safe? **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 5, p. 356-363, 2012.
- FESTY, F.; HOAREAU, L.; BES-HOUTMANN, S.; PÉQUIN, A. M.; GONTHIER, M. P.; MUNSTUN, A.; HOAREAU, J. J.; CÉSARI, M.; ROCHE, R. Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, 124, N. 2, p. 113-121, 2005.
- FIORINA, P.; JUREWICZ, M.; AUGELLO, A.; VERGANI, A.; DADA, S.; LA ROSA, S.; SELIG, M.; GODWIN, J.; LAW, K.; PLACIDI, C.; SMITH, R. N.; CAPELLA, C.; RODIG, S.; ADRA, C. N.; ATKINSON, M.; SAYEGH, M. H.; ABDI, R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 993-1004, 2009.
- FONSATTI, E.; JEKUNEN, A. P.; KAIREMO, K. J.; CORAL, S.; SNELLMAN, M.; NICOTRA, M. R.; NATALI, P. G.; ALTOMONTE, M.; MAIO, M. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 2037-2043, 2000.
- FONSATTI, E.; NICOLAY, H. J.; ALTOMONTE, M.; COVRE, A.; MAIO, M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 1, p. 12-19, 2010.
- FORONI, C.; GALLI, R.; CIPELLETI, B.; CAUMO, A.; ALBERTI, S.; FIOCCO, R.; VESCOVI, A. Resilience to transformation and functional stability of adult neural stem cell *ex vivo*. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3725-3733, 2007.
- FORRISTAL, C. E.; CHRISTENSEN, D. R.; CHINNERY, F. E.; PETRUZZELLI, R.; PARRY, K. L.; SANCHEZ-ELSNER, T.; HOUGHTON, F. D. Environmental oxygen tension regulates the energy metabolism and self-renewal of human embryonic stem cells. **PLoS One**, v. 8, n. 6, e62507, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645991/>>. Acesso em 23/02/2014.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetics**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLASOVA, U. F.; KULAGINA, N. N.; PANASUK, A. F.; RUDAKOWA, S. F.; LURIÁ, E. A.; RUADKOW, I. A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. **Experimental Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

FROELICH, K.; MICKLER, J.; STEUSLOFF, G.; TECHNAU, A.; TIRADO, M. R.; SCHERZED, A.; HACKENBERG, S.; RADELOFF, A.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion *in vitro*. **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 767-781, 2013.

FU, X.; FANG, L.; LI, X.; CHENG, B.; SHENG, Z. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 3, p. 325-335, 2006.

FUNK, W. D.; LABAT, I.; SAMPATHKUMAR, J.; GOURRAUD, P. A.; OKSENBERG, J. R.; ROSLER, E.; STEIGER, D.; SHEIBANI, N.; CAILLIER, S.; STACHE-CRAIN, B.; JOHNSON, J. A.; MEISNER, L.; LACHER, M. D.; CHAPMAN, K. B.; PARK, M. J.; SHIN, K. J.; DRMANAC, R.; WEST, M. D. Evaluating the genomic and sequence integrity of human ES cell lines; comparison to normal genomes. **Stem Cell Research**, v. 8, n. 2, p. 154-164, 2012.

GAEBEL, R.; FURLANI, D.; SORG, H.; POLCHOW, B.; FRANK, J.; BIEBACK, K.; WANG, W.; KLOPSCH, C.; ONG, L.-L.; LI, W.; MA, N.; STEINHOFF, G. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. **PLoS One**, v. 6, n. 2, e15652, 2011 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037376/>>. Acesso em 02/01/2014.

GARCIA, S.; MARTÍN, S. C.; DE LA FUENTE, R.; CIGUDOSA, J. C.; GARCIA-CASTRO, J.; BERNAD, A. Pitfalls in spontaneous *in vitro* transformation of human mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 9, p. 1648-1650, 2010.

GARCIA-OLMO, D.; HERREROS, D.; PASCUAL, M.; PASCUAL, I.; DE-LA-QUINTANA, P.; TREBOL, J.; GARCIA-ARRANZ, M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 24, n. 1, p. 27-30, 2009.

GARROVO, C.; BERGAMIN, N.; BATES, D.; CEsSELLI, D.; BELTRAMI, A. P.; LORENZON, A.; FERRARI, R.; ALBERTO BELTRAMI, C.; LORUSSO, V.; BIFFI, S. *In vivo* tracking of murine adipose tissue-derived multipotent adult stem cells and *ex vivo* cross-validation. **International Journal of Molecular Imaging**, v. 2013, n. 426961, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562659/>>. Acesso em 15/03/2014.

GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. **The principles of clinical genetics**. New Jersey: Human Press Inc., 1999.

GIL-PEROTIN, S.; MARIN-HUSSTEGE, M.; LI, J.; SORIANO-NAVARRO, M.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M. F.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; CASACCIA-BONNEFIL, P. Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1107-1116, 2006.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F.; BUNNELL, B. A. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 2, 2010 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905095/>>. Acesso em 08/11/2013.

GONZALEZ-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZÁLEZ, M. A.; RICO, L.; BÜSCHER, D.; DELGADO, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**, v. 58, n. 7, p. 929-939, 2009.

GONZÁLEZ, M. A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BÜSCHER, D.; DELGADO, M. Adipose-derived

mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. **Gastroenterology**, v. 136, n. 3, p. 978-989, 2009.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306-313, 2012.

GRIMES, B. R.; STEINER, C. M.; MERFELD-CLAUSS, S.; TRAUKTUEV, D. O.; SMITH, D.; REESE, A.; BREMAN, A. M.; THURSTON, V. C.; VANCE, G. H.; JOHNSTONE, B. H.; SLEE, R. B.; MARCH, K. L. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 5, p. 717-724, 2009.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D. M.; LEDDY, H. A.; ROBEY, P. G.; STORMS, R. W.; GIMBLE, J. M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 189, n. 1, p. 54-63, 2001.

GRUENLOH, W.; KAMBAL, A.; SONDERGAARD, C.; MCGEE, J.; NACEY, C.; KALOMOIRIS, S.; PEPPER, K.; OLSON, S.; FIERRO, F.; NOLTA, J. A. Characterization and *in vivo* testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering, Part A**, v. 17, n. 11-12, p. 1517-1525, 2011.

GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; HANSEN, P.; FRANCISCO, J. C.; BROFMAN, P. R. S. O transplante em conjunto de células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais (cocultivadas) na disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 4, p. 288-293, 2004.

GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J. R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 20, n. 3, p. 270-278, 2005.

GUERRERO-ESTEO, M.; LASTRES, P.; LETAMENDÍA, A.; PÉREZ-ALVAREZ, M. J.; LANGA, C.; LÓPEZ, L. A.; FABRA, A.; GARCÍA-PARDO, A.; VERA, S.; LETARTE, M.; BERNABÉU, C. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. **European Journal of Cellular Biology**, v. 78, n. 9, p. 614-623, 1999.

GUILBERT, S. F. Cell surface receptors and their signal transduction pathways. In: _____. **Developmental Biology**. 6a. ed. [Internet]. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10043/>>. Acesso em 17 de Abril de 2014.

GUILLOT, P. V.; GÖTERSTROM, C.; CHAN, J.; KURATA, H.; FISK, N. M. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. **Stem Cells**, v. 25, n. 3, p. 646-654, 2007.

GUPTA, N.; SU, X.; POPOV, B.; LEE, J. W.; SERIKOV, V.; MATTHAY, M. A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1855-1863, 2007.

HALBERSTADT, C.; AUSTIN, C.; ROWLEY, J.; CULBERSON, C.; LOEBSACK, A.; WYATT, S.; COLEMAN, S.; BLACKSTEN, L.; BURG, K.; MOONEY, D.; HOLDER, W. A hydrogel material for plastic and reconstructive applications injected into the subcutaneous space of a sheep. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 309-319, 2002.

HALL, P. A.; WATT, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, v. 106, n. 4, p. 619-633, 1989.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARRISON, N. J. Genetic instability in neural stem cells: an inconvenient truth? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 2, p. 484-486, 2012.

HARTUNG, T.; BALLS, M.; BARDOUILLE, C.; BLANCK, O.; COECKE, S.; GSTRUNTHALER, G.; LEWIS, D. Good cell culture practice. ECVAM Good cell culture practice task force report 1. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, n. 4, p. 407-414, 2002.

HAWINKELS, L. J.; KUIPER, P.; WIERCINSKA, E.; VERSPAGET, H. W.; LIU, Z.; PARDALI, E.; SIER, C. F.; TEN DIJKE, P. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 70, n. 10, p. 4141-4150, 2010.

HENQ, H. H. Q.; YE, C. J.; YANG, F.; EBRAHIM, S.; LIU, G.; BREMER, S. W.; THOMAS, C. M.; YE, J.; CHEN, T. J.; TUCK-MULLER, C.; YU, J. W.; KRAWETZ, S. A.; JOHNSON, A. Analysis of marker or complex chromosomal rearrangements present in pre- and post-natal karyotypes utilizing a combination of G-banding, spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. **Clinical Genetics**, v. 63, n. 5, p. 358-367, 2003.

HOLZWARTH, C.; VAEGLER, M.; GIESEKE, F.; PFISTER, S. M.; HANDGRETINGER, R.; KERST, G.; MÜLLER, I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. **BMC Cell Biology**, v. 28, n. 11, e11, 2010 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2827377/>>. Acesso em 12/11/2013.

HOOKE, E. B. Models and assumptions in calculating the probabilities of detecting chromosomal mosaicism. **Human Genetics**, v. 40, n. 2, p. 235-239, 1978.

HORMOZ, S. Stem cell population asymmetry can reduce rate of replicative aging. **Journal of Theoretical Biology**, v. 331, p. 19-27, 2013.

HORWITZ, E. M.; LE BLANCA, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HOWE, B.; UMRIGAR, A.; TSIEN, F. Chromosome preparation from cultured cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 28, n. 83, e50203, 2014. [Internet] Disponível em <<http://www.jove.com/video/50203/chromosome-preparation-from-cultured-cells>>. Acesso em 15/02/2014.

HU, Y.; LIAO, L.; WANG, Q.; MA, L.; MA, G.; JIANG, X.; ZHAO, R. C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, n. 5, p. 342-349, 2003.

HUSS, R.; LANGE, C.; WEISSINGER, E. M.; KOLB, H. J.; THALMEIER, K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34^{low} hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**, v. 18, n. 4, p. 252-260, 2000.

HWANG, N. S.; VARGHESE, S.; ELISSEEFF, J. Controlled differentiation of stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 199-214, 2008.

IMREH, M. P.; GERTOW, K.; CEDERVALL, J.; UNGER, C.; HOLMBERG, K.; SZÖKE, K.; CSÖREGH, L.; FRIED, G.; DILBER, S.; BLENNOW, E.; AHRLUND-RICHTER, L. *In vitro* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 508-516, 2006.

INOUE, K.; MALLAKIN, A.; FRAZIER, D. P. Dmp1 and tumor suppression. **Oncogene**, v. 26, n. 30, p. 4329-4335, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Titulos/Nomenclatura_colo_do_uterio.pdf>. Acesso em: 02/03/2014.

IRIODA, A. C.; ZOCHE, L.; SOUZA, C. M. C. O.; FERREIRA, R. J.; ALIPRANDINI, E.; CUNHA, R. C.; FRANCISCO, J. C.; GUARITA-SOUZA, L. C.; MALVEZZI, M.; BELTRAME, M. P.; MESQUITA, L. A. F.; KUCZERA, D.; CHACHQUES, J. C.; CARVALHO, K. A. T. Pap test as the first step in screening genetic stability in cell-based therapy. **Journal of Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 3, p. 1000106, 2011.

IZADPANAH, R.; KAUSHAL, D.; KRIEDT, C.; TSIEN, F.; PATEL, B.; DUFOUR, J.; BUNNELL, B. A. Long-term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 11, p. 4229-4238, 2008.

IZADPANAH, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A. Biological properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1285-1297, 2006.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**, 5a. ed. [Internet]. New York: Garland Science, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10755/>>. Acesso em 15/02/2014.

JAZEDJE, T.; PERIN, P. M.; CZERESNIA, C. E.; MALUF, M.; HALPERN, S.; SECCO, M.; BUENO, D. F.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; ZATZ, M. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *Journal of Translational Medicine*, v. 7, n. 1, p. 46, 2009.

JEON, E. S.; MOON, H. J.; LEE, M. J.; SONG, H. Y.; KIM, Y. M.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S.; KIM, J. H. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *Journal of Cell Science, Part 23*, v. 119, p. 4994-5005, 2006.

JEONG, J. O.; HAN, J. W.; KIM, J. M.; CHO, H. J.; PARK, C.; LEE, N.; KIM, D. W.; YOON, Y. S. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circulation Research*, v. 108, n. 11, p. 1340-1347, 2011.

JIANG, T.; LIU, W.; LV, X.; SUN, H.; ZHANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, W. J.; CAO, Y.; ZHOU, G. Potent *in vitro* chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, v. 31, n. 13, p. 3564-3571, 2010.

JIN, H. J.; PARK, S. K.; OH, W.; YANG, Y. S.; KIM, S. W.; CHOI, S. J. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 381, n. 4, p. 676-681, 2009.

JONKER, L.; ARTHUR, H. M. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mechanisms and Development*, v. 110, n. 1-2, p. 193-196, 2002.

JOSSE, C.; SCHOEMANS, R.; NIESSEN, N. A.; DELGAUDINE, M.; HELLIN, A. C.; HERENS, C.; DELVENNE, P.; BOURS, V. Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, v. 19, n. 8, p. 1167-1173, 2010.

KANG, S. K.; SHIN, M. J.; JUNG, J. S.; KIM, Y. G.; KIM, C. H. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells and Development*, v. 15, n. 4, p. 583-594, 2006.

KARIMI-ZARCHI, M.; PEIGHMBARI, F.; KARIMI, N.; ROHI, M.; CHITI, Z. A Comparison of 3 ways of conventional pap smear, liquid-based cytology and colposcopy vs cervical biopsy for early diagnosis of premalignant lesions or cervical cancer in women with abnormal conventional Pap test. *International Journal of Biomedical Science*, v. 9, n. 4, p. 205-210, 2013.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KIM, S. O.; NA, H. S.; KWON, D.; JOO, S. Y.; KIM, H. S.; AHN, Y. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model. *Urologic Internationalis*, v. 86, n. 1, p. 110-116, 2011.

KIM, Y.; KIM, H.; CHO, H.; BAE, Y.; SUH, K.; JUNG, J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cellular Physiology Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 20, n. 6, p. 867-876, 2007.

KLEFFEL, S.; SCHATTON, T. Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 734, p. 145-179, 2013.

KNUTH, C. A.; CLARK, M. E.; MEESON, A. P.; KHAN, S. K.; DOWEN, D. J.; DEEHAN, D. J.; OLDERSHAW, R. A. Low oxygen tension is critical for the culture of human mesenchymal stem cells with strong osteogenic potential from haemarthrosis fluid. *Stem Cell Reviews*, v. 9, n. 5, p. 599-608, 2013.

KOIDE, Y.; MORIKAWA, S.; MABUCHI, Y.; MUGURUMA, Y.; HIRATSU, E.; HASEGAWA, K.; KOBAYASHI, M.; ANDO, K.; KINJO, K.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow. *Stem Cells*, v. 25, n. 5, p. 1213-1221, 2007.

KRAMPERA, M.; SARTORIS, S.; LIOTTA, F.; PASINI, A.; ANGELI, R.; COSMI, L.; ANDREINI, A.; MOSNA, F.; BONETTI, B.; REBELLATO, E.; TESTI, M. G.; FROSALI, F.; PIZZOLO, G.; TRIDENTE, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 797-810, 2007.

KRIVTSOV, A. V.; TWOMEY, D.; FENG, Z.; STUBBS, M. C.; WANG, Y.; FABER, J.; LEVINE, J. E.; WANG, J.; HAHN, W. C.; GILLILAND, D. G.; GOLUB, T. R.; ARMSTRONG, S. A. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 818-822, 2006.

KUO, C. K.; TUAN, R. S. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering, Part A**, v. 14, n. 10, p. 1615-1627, 2008.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE, H. C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 8, p. 3861-3868, 1998.

LANGE, C.; CAKIROGLU, F.; SPIESS, A. N.; CAPPALLO-OBBERMANN, H.; DIERLAMM, J.; ZANDER, A. R. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 1, p. 18-26, 2007.

LAPOUGE, G.; BLANPAIN, C. **Medical applications of epidermal stem cells**. In: StemBook [Internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27047>>. Acesso em 20/12/2013.

LATHIA, J. D.; VENERE, M.; RAO, M. S.; RICH, J. N. Seeing is believing: are cancer stem cells the Loch Ness monster of tumor biology? **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 2, p. 227-237, 2011.

LEE, M. S.; LILL, M.; MAKKAR, R. R. Stem cell transplantation in myocardial infarction. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 2, p. 82-98, 2004.

LEE, N. Y.; BLOBE, G. C. The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21507-21517, 2007.

LEE, S. T.; CHU, K.; JUNG, K. H.; IM, W. S.; PARK, J. E.; LIM, H. C.; WON, C. H.; SHIN, S. H.; LEE, S. K.; KIM, M.; ROH, J. K. Slowed progression in models of Huntington disease by adipose stem cell transplantation. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 5, p. 671-688, 2009.

LEFRÈRE, J. J.; BERCHE, P. La thérapeutique du docteur Brown-Séquard. **Annales d'endocrinologie**, v. 71, n. 2, p. 69-75, 2010.

LEU, S.; LIN, Y. C.; YUEN, C. M.; YEN, C. H.; KAO, Y. H.; SUN, C. K.; YIP, H. K. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, e63, 2010 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913939/>>. Acesso em 06/03/2013.

LEVI, B.; WAN, D. C.; GLOTZBACH, J. P.; HYUN, J.; JANUSZYK, M.; MONTORO, D.; SORKIN, M.; JAMES, A. W.; NELSON, E. R.; LI, S.; QUARTO, N.; LEE, M.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39497-39509, 2011.

LEYVA-LEYVA, M.; BARRERA, L.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; ARRIAGA-PIZANO, L.; OROZCO-HOYUELA, G.; CARRILLO-CASAS, E. M.; CALDERÓN-PÉREZ, J.; LÓPEZ-DÍAZ, A.; HERNÁNDEZ-AGUILAR, F.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, R.; KAWA, S.; CHIMAL-MONROY, J.; FUENTES-MERA, L. Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 8, p. 1275-1287, 2013.

LICHTENBELT, K. D.; KNOERS, N. V. A. M.; SCHURING-BLOM, G. H. From karyotyping to array-CGH in prenatal diagnosis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 135, n. 3-4, p. 241-250, 2011.

^aLIN, G.; BANIE, L.; NING, H.; BELLA, A. J.; LIN, C. S.; LUE, T. F. Potential of adipose-derived stem cells for treatment of erectile dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, Suppl. 3, p. 320-37, 2009 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895916/>>. Acesso em 10/12/2013.

^bLIN, G.; WANG, G.; BANIE, L.; NING, H.; SHINDEL, A. W.; FANDEL, T. M.; LUE, T. F.; LIN, C. S.

Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. **Cytotherapy**, v. 12, n. 1, p. 88-95, 2010.

°LIN, G.; WANG, G.; LIU, G.; YANG, L. J.; CHANG, L. J.; LUE, T. F.; LIN, C. S. Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1. **Stem Cells Development**, v. 18, n. 10, p. 1399-1406, 2009.

LINDROOS, B.; AHO, K. L.; KUOKKANEN, H.; RÄTY, S.; HUHTALA, H.; LEMPONEN, R.; YLI-HARJA, O.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. **Tissue Engineering, Part A**, v. 16, n. 7, p. 2281-2294, 2010.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 7, n. 2, p. 269-291, 2011.

LIU, K.; LIU, R.; CAO, G.; SUN, H.; WANG, X.; WU, S. Adipose-derived stromal cell autologous transplantation ameliorates pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in rat models. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 6, p. 1001-1010, 2011.

LIU, L.; GAO, J.; YUAN, Y.; CHANG, Q.; LIAO, Y.; LU, F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. **Cell Biology International**, v. 37, n. 6, p. 551-560, 2013.

LIU, L.; ZHAO, S.; CHEN, B.; HAN, Q.; LIAO, L.; JIA, M.; CAO, Y.; MA, J.; SUN, Q.; GUO, M.; LIU, Z.; AI, H.; ZHAO, R. C. *Ex vivo* expansion and *in vivo* infusion of bone marrow-derived Flk-1⁺CD31⁺CD34⁺ mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 3, p. 349-357, 2006.

LIU, Y.; JOVANOVIĆ, B.; PINS, M.; LEE, C.; BERGAN, R. C. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. **Oncogene**, v. 21, n. 54, p. 8272-8281, 2002.

LIU, Z.; WANG, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; LIN, Q.; WANG, Y.; DUAN, C.; WU, K.; WANG, C. Efficient Isolation of Cardiac Stem Cells from Brown Adipose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, e104296, 2010 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855990/>>. Acesso em 10/12/2013.

LIZIER, N. F.; KERKIS, A.; GOMES, C. M.; HEBLING, J.; OLIVEIRA, C. F.; CAPLAN, A. I.; KERKIS, I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PLoS One**, v. 7, n. 6, e39885, 2012 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387222/>>. Acesso em 05/11/2013.

LOBO, N. A.; SHIMONO, Y.; QIAN, D.; CLARKE, M. F. The biology of cancer stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 675-699, 2007.

LÓPEZ-NOVOA, J. M. Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 22, n. 3, p. 712-714, 2007.

LÓPEZ-NOVOA, J. M.; BERNABEU, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. **The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, H959-H979, 2010.

LOVELL, M. J.; MATHUR, A. The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 1, p. 67-87, 2004.

MA, X.; LABINAZ, M.; GOLDSTEIN, J.; MILLER, H.; KEON, W. J.; LETARTE, M.; O'BRIEN, E. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 12, p. 2546-2552, 2000.

MAAS, S. A.; DONGHIA, N. M.; TOMPKINS, K.; FOREMAN, O.; MILLS, K. D. ARTEMIS stabilizes the genome and modulates proliferative responses in multipotent mesenchymal cells. **BMC Biology**, v. 8, p. 132, 2010.

MABUCHI, Y.; HOULIHAN, D. D.; AKAZAWA, C.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. **Stem Cells International**, v. 2013, e507301 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673454/>>. Acesso em 10/02/2014.

- MADDOX, J. R.; LIAO, X.; LI, F.; NIYIBIZI, C. Effects of culturing on the stability of the putative murine adipose derived stem cells markers. **The Open Stem Cell Journal**, v. 1, p. 54-61, 2009 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2783658/>>. Acesso em 15/03/2014.
- MAHMOOD, A.; LU, D.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. **Neurosurgery**, v. 53, n. 3, p. 697-702, 2003.
- MAITRA, A.; ARKING, D. E.; SHIVAPURKAR, N.; IKEDA, M.; STASTNY, V.; KASSAUEI, K.; SUI, G.; CUTLER, D. J.; LIU, Y.; BRIMBLE, S. N.; NOAKSSON, K.; HYLLNER, J.; SCHULZ, T. C.; ZENG, X.; FREED, W. J.; CROOK, J.; ABRAHAM, S.; COLMAN, A.; SARTIPY, P.; MATSUI, S.; CARPENTER, M.; GAZDAR, A. F.; RAO, M.; CHAKRAVARTI, A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 10, p. 1099-1103, 2005.
- MANDEL, K.; YANG, Y.; SCHAMBACH, A.; GLAGE, S.; OTTE, A.; HASS, R. Mesenchymal stem cells directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 23, p. 3114-3127, 2013.
- MARTINS-TAYLOR, K.; XU, R. H. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 30, n. 1, p. 22-27, 2012.
- MAUMUS, M.; PEYRAFITTE, J. A.; D'ANGELO, R.; FOURNIER-WIRTH, C.; BOULOUMIÉ, A.; CASTEILLA, L.; SENGENÈS, C.; BOURIN, P. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 9, p. 1141-1153, 2011.
- MERCHAN, J.; TAN, S. Y. Alex Carrel (1873-1944): pioneer of vascular surgery and organ transplantation. **Medicine in Stamps**, v. 54, n. 11, p. 602-603, 2013.
- MESIMÄKI, K.; LINDROOS, B.; TÖRNWALL, J.; MAUNO, J.; LINDQVIST, C.; KONTIO, R.; MIETTINEN, S.; SUURONEN, R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 38, n. 3, p. 201-209, 2009.
- MEYERROSE, T. E.; DE UGARTE, D. A.; HOFLING, A. A.; HERRBRICH, P. E.; CORDONNIER, T. D.; SHULTZ, L. D.; EAGON, J. C.; WIRTHLIN, L.; SANDS, M. S.; HEDRICK, M. A.; NOLTA, J. A. *In vivo* distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. **Stem Cells**, v. 25, n. 1, p. 220-227, 2007.
- MEZA-ZEPEDA, L. A.; NOER, A.; DAHL, J. A.; MICCI, F.; MYKEBLOST, O.; COLLAS, P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose stem cells cultured to senescence. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 553-563, 2008.
- MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cell**, v. 24, n. 11, p. 2319-2345, 2006.
- MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.
- MITCHELL, J. B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; FLOYD, Z. E.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 376-385, 2006.
- MIURA, M.; MIURA, Y.; PADILLA-NASH, H. M.; MOLINOLO, A. A.; FU, B.; PATEL, V.; SEO, B. M.; SONOYAMA, W.; ZHENG, J. J.; BAKER, C. C.; CHEN, W.; RIED, T.; SHI, S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. **Stem Cells**, v. 24, n. 4, p. 1095-1103, 2006.
- MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **Journal of Nippon Medical School**, v. 76, n. 2, p. 56-66, 2009.
- MOHRIN, M.; BOURKE, E.; ALEXANDER, D.; WARR, M. R.; BARRY-HOLSON, K.; LE BEAU, M. M.; MORRISON, C. G.; PASSEGUÉ, E. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2, p. 174-185, 2010.
- MOHSENY, A. B.; SZUHAI, K.; ROMEO, S.; BUDDINGH, E. P.; BRIARE-DE BRUIJN, I.; DE JONG, D.; VAN PEL, M.; CLETON-JANSEN, A. M.; HOGENDOORN, P. C. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. **The**

Journal of Pathology, v. 219, n. 3, p. 294-305, 2009.

MOON, M. H.; KIM, S. Y.; KIM, Y. J.; KIM, S. J.; LEE, J. B.; BAE, Y. C.; SUNG, S. M.; JUNG, J. S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 279-290, 2006.

MOORE, T. B.; CAMPBELL, K. J.; FEIG, S. A. Stem cells carrying abnormal karyotype engraft after cord blood stem cell transplant. **Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v. 27, n. 2, p. 118-119, 2005.

MORI, N.; OKUMOTO, M.; YAMATE, J. A susceptibility locus for radiation lymphomagenesis on mouse chromosome 16. **Journal of Radiation Research**, v. 41, n. 4, p. 367-372, 2000.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-1074, 2006.

MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 10, p. 1449-1470, 2010.

MÜLLER, I.; KORDOWICH, S.; HOLZWARTH, C.; SPANO, C.; ISENSEE, G.; STAIBER, A.; VIEBAHN, S.; GIESEKE, F.; LANGER, H.; GAWAZ, M. P.; HORWITZ, E. M.; CONTE, P.; HANDGRETINGER, R.; DOMINICI, M. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. **Cytotherapy**, v. 8, n. 5, p. 437-444, 2006.

MUNTEAN, M. Cytological identification of the (pre)cancerous cervical lesions within a clinically asymptomatic female population. **Current Health Science Journal**, v. 35, n. 3, p. 176-179, 2009.

MUNTIÓN, S.; SÁNCHEZ-GUIJO, F. M.; CARRANCIO, S.; VILLARÓN, E.; LÓPEZ, O.; DIEZ-CAMPELO, M.; SAN MIGUEL, J. F.; DEL CAÑIZO, M. C. Optimization of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implications for clinical use. **Transfusion Medicine**, v. 22, n. 2, p. 122-127, 2012.

MURPHY, J. M.; FINK, D. J.; HUNZIKER, E. B.; BARRY, F. P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 12, p. 3464-3474, 2003.

NAIB, Z. M. Pap test. In: WALKER, H. K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. **Clinical Methods**, 3ª. ed. [Internet]. Boston: Butterworths, 1990. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK201/>>. Acesso em 20/05/2012.

NANDA, K.; McCrory, D. C.; MYERS, R. R.; BASTIAN, L. A.; HASSELBLAD, V.; HICKEY, J. D.; MATCHAR, D. B. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 10, p. 810-819, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Bethesda System Website Atlas** [Internet]. Disponível em <<http://nih.techriver.net/index.php>>. Acesso em 05/06/2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cervical Cancer Screening (PDQ®)** [Internet]. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/cervical/HealthProfessional/page2#Section_54>. Acesso em 02/05/2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. **Journal of American Medical Association**, v. 262, n. 7, p. 931-934, 1989.

^aNIH, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **CLINICALTRIALS.GOV** [Internet]. Disponível em <<http://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=marrow+stem&recr=Open>>. Acesso em 14/02/2014.

^bNIH, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **CLINICALTRIALS.GOV** [Internet]. Disponível em <<http://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=adipose+stem&recr=Open>>. Acesso em 14/02/2014.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J. L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 7, p. 928-937, 2008.

NOËL, D.; CATON, D.; ROCHE, S.; BONY, C.; LEHMANN, S.; CASTEILLA, L.; JORGENSEN, C.; COUSIN, B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 7, p. 1575-1584,

2008.

NUTIU, R.; BILLEN, L. P.; LI, Y. Fluorescence-signaling nucleic acid-based sensors. In: **Madame Curie Bioscience Database** [Internet]. Austin: Landes Bioscience, 2000. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5967/>>. Acesso em 06/05/2013.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.

OGAWA, M.; LARUE, A. C.; DRAKE, C. J. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2893-2895, 2006.

OHSHIMA, S.; SEYAMA, A. Establishment of proliferative tetraploid cells from normal human fibroblasts. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. 198, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730083/>>. Acesso em 22/12/2013.

OLIVEIRA, P. H.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M.; GIMBLE, J. M.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. Impact of hypoxia and long-term cultivation on the genomic stability and mitochondrial performance of ex vivo expanded human stem/stromal cells. **Stem Cell Research**, v. 9, n. 3, p. 225-236, 2012.

ONG, W. K.; TAN, C. S.; CHAN, K. L.; GOESANTOSO, G. G.; CHAN, X. H.; CHAN, E.; YIN, J.; YEO, C. R.; KHOO, C. M.; SO, J. B.; SHABBIR, A.; TOH, S. A.; HAN, W.; SUGII, S. Identification of specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 2, p. 171-179, 2014.

ORTIZ, L. A.; GAMBELLI, F.; McBRIDE, C.; GAUPP, D.; BADDOO, M.; KAMINSKI, N.; PHINNEY, D. G. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.

OSWALD, J.; BOXBERGER, S.; JØRGENSEN, B.; FELDMANN, S.; EHNINGER, G.; BORNHÄUSER, M.; WERNER, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, v. 22, n. 3, p. 377-384, 2004.

OTTE A, BUCAN V, REIMERS K, HASS R. Mesenchymal stem cells maintain long-term *in vitro* stemness during explant culture. **Tissue Engineering, Part C Methods**, v. 19, n. 2, p. 937-948, 2013.

PACHÓN-PEÑA, G.; YU, G.; TUCKER, A.; WU, X.; VENDRELL, J.; BUNNELL, B. A.; GIMBLE, J. M. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 3, p. 843-851, 2011.

PANEPUCCI, R. A.; SIUFI, J. L.; SILVA JR., W. A.; PROTO-SQUIERA, R.; NEDER, L.; ORELLANA, M.; ROCHA, V.; COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1263-1278, 2004.

PARK, H. W.; SHIN, J. S.; KIM, C. W. Proteome of mesenchymal stem cells. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2881-2894, 2007.

PARK, T. S.; DONNENBERG, V. S.; DONNENBERG, A. D.; ZAMBIDIS, E. T.; ZIMMERLIN, L. Dynamic interactions between cancer stem cells and their stromal partners. **Current Pathobiology Reports**, v. 2, n. 1, p. 41-52, 2014.

PĂUNESCU, V.; DEAK, E.; HERMAN, D.; SISK, I. R.; TĂNASIE, G.; BUNU, C.; ANGHEL, S.; TATU, C. A.; OPREA, T. I.; HENSCHLER, R.; RÜSTER, B.; BISTRIAN, R.; SEIFRIED, E. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 502-508, 2007.

PAZDRO, R.; HARRISON, D. E. Murine adipose tissue-derived stromal cell apoptosis and susceptibility to oxidative stress in vitro are regulated by genetic background. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e61235, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617166/>>. Acesso em 12/01/2014.

PECE-BARBARA, N.; VERA, S.; KATHIRKAMATHAMBY, K.; LIEBNER, S.; DI GUGLIELMO, G. M.; DEJANA, E.; WRANA, J. L.; LETARTE, M. Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27800-27808, 2005.

PÉREZ-GÓMEZ, E.; ELENO, N.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; RAMIREZ, J. R.; VELASCO, B.; LETARTE, M.; BERNABÉU, C.; QUINTANILLA, M. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects

on tumor development. **Oncogene**, v. 24, n. 27, p. 4450-4461, 2005.

PÉREZ-ILZARBE, M.; DÍEZ-CAMPELO, M.; ARANDA, P.; TABERA, S.; LOPEZ, T.; DEL CAÑIZO, C.; MERINO, J.; MORENO, C.; ANDREU, E. J.; PRÓSPER, F.; PÉREZ-SIMÓN, J. A. Comparison of *ex vivo* expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. **Transfusion**, v. 49, n. 9, p. 1901-1910, 2009.

PERLINGEIRO, R. C. Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. **Development**, v. 134, n. 16, p. 3041-3048, 2007.

PISKOROWSKA, J.; GAJEWSKA, M.; SZYMAŃSKA, H.; KRYSIAK, E.; QUAN, L.; GRYGALEWICZ, B.; SKURZAK, H. M.; CZARNOMSKA, A.; PIENKOWSKA-GRELA, B.; DEMANT, P. Susceptibility loci and chromosomal abnormalities in radiation induced hematopoietic neoplasms in mice. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 2, p. 147-158, 2011.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLONI, A.; MAURIZI, G.; BABINI, L.; SERRANI, F.; BERARDINELLI, E.; MANCINI, S.; COSTANTINI, B.; DISCEPOLI, G. LEONI, P. Human mesenchymal stem cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive *in vitro* expansion. **Cell transplantation**, v. 20, n. 5, p. 643-654, 2011.

PRICE, M. J.; CHOU, C. C.; FRANTZEN, M.; MIYAMOTO, T.; KAR, S.; LEE, S.; SHAH, P. K.; MARTIN, B. J.; LILL, M.; FORRESTER, J. S.; CHEN, P. S.; MAKKAR, R. R. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. **International Journal of Cardiology**, v. 111, n. 2, n p. 231-239, 2006.

PRZEBORSKI, S. A. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1242-1250, 2005.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 1, p. 118-129, 2005.

QUAIL, D. F.; TAYLOR, M. J.; POSTOVIT, L. M. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 197-216, 2012.

QUINTANA, E.; SHACKLETON, M.; SABEL, M. S.; FULLEN, D. R.; JOHNSON, T. M.; MORRISON, S. J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. **Nature**, v. 456, n. 7222, p. 593-598, 2008.

QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

RA, J. C.; SHIN, I. S.; KIM, S. H.; KANG, S. K.; KANG, B. C.; LEE, H. Y.; KIM, Y. J.; JO, J. Y.; YOON, E. J.; CHOI, H. J.; KWON, E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. **Stem Cells Development**, v. 20, n. 8, p. 1297-1308, 2011.

RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. **Stem Cell Reviews**, v. 7, n. 1, p. 64-76, 2011.

RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. On the origin of the term "stem cell". **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 35-38, 2007.

REGE, T. A.; HAGOOD, J. S. Thy-1 as regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 8, p. 1045-1054, 2006.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2615-2625, 2001.

RICCI-VITIANI, L.; LOMBARDI, D. G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; TODARO, M.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 111-115, 2007.

RIUS DÍAZ, F.; BARÓN LOPÉS, F. J. **Bioestatística**. São Paulo: Thomson, 2007.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 125-128, 2005.

^aROEMELING-VAN RHIJN, M.; DE KLEIN, A.; DOUBEN, H.; PAN, Q.; VAN DER LAAN, L. J.; IJZERMANS, J. N.; BETJES, M. G.; BAAN, C. C.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M. J. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 11, p. 1352-1361, 2013.

^bROEMELING-VAN RHIJN, M.; MENSAH, F. K.; KOREVAAR, S. S.; LEIJS, M. J.; VAN OSCH, G. J.; IJZERMANS, J. N.; BETJES, M. G.; BAAN, C. C.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M. J. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, e203, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714546/>>. Acesso em 23/02/2014.

RØSLAND, G. V.; SVENDESEN, A.; TORSVIK, A.; SOBALA, E.; MCCORMACK, E.; IMMERVOLL, H.; MYSLIWETZ, J.; TONN, J. C.; GOLDBRUNNER, R.; LØNNING, P. E.; BJERKVIG, R.; SCHICHOR, C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. **Cancer Research**, v. 69, n. 13, p. 5331-5339, 2009.

ROSU-MYLES, M.; FAIR, J.; PEARCE, N.; MEHIC, J. Non-multipotent stroma inhibit the proliferation and differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro*. **Cytotherapy**, v. 12, n. 6, p. 818-830, 2010.

RUBIO, D.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTÍN, M. C.; DE LA FUENTE, R.; CIGUDOSA, J. C.; LLOYD, A. C.; BERNAD, A. Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3035-3039, 2005.

RYU, H. H.; LIM, J. H.; BYEON, Y. E.; PARK, J. R.; SEO, M. S.; LEE, Y. W.; KIM, W. H.; KANG, K. S.; KWEON, O. K. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 4, p. 273-284, 2009.

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 8, p. 2521-2529, 2005.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**, v. 31, n. 8, p. 595-596, 2010.

SANTIBANEZ, J. F.; PÉREZ-GOMÉZ, E.; FERNANDEZ-L, A.; GARRIDO-MARTIN, E. M.; CARNERO, A.; MALUMBRES, M.; VARY, C. P. H.; QUINTANILLA, M.; BERNABÉU, C. The TGF- β co-receptor endoglin modulates the expression and transforming potential of *H-Ras*. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 12, p. 2145-2154, 2010.

SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J.; NAKAMURA, K.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; SATO, T.; MIYANISHI, K.; TAKAYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKIMOTO, R.; IYAMA, S.; MATSUNAGA, T.; OHTANI, S.; MATSUURA, A.; HAMADA, H.; NIITSU, Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 756-763, 2005.

SCHENKE-LAYLAND, K.; STREM, B. M.; JORDAN, M. C.; DEEMEDIO, M. T.; HEDRICK, M. H.; ROOS, K. P.; FRASER, J. K.; MACLELLAN, W. R. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. **The Journal of Surgical Research**, v. 153, n. 2, p. 217-223, 2009.

SCHERES, V. M. J. C. Identification of two robertsonian translocation with a Giemsa banding technique. **Humangenetik**, v. 15, n. 3, p. 253-256, 1972.

SENSEBÉ, L.; TARTE, K.; GALIPEAU, J.; KRAMPERA, M.; MARTIN, I.; PHINNEY, D. G.; SHI, Y. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. **Cells Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 9-10, 2012.

SETHE, S.; SCUTT, A.; STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Research Review**,

v. 5, n. 1, p. 91-116, 2006.

SHAFFER, L. G.; SLOVAK, M. L.; CAMPBELL, L. J. **ISCN, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel: S Karger AG, 2009.

SHAHDAFAR, A.; FRØNSDAL, K.; HAUG, T.; REINHOLT, F. P.; BRINCHMANN, J. E. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1357-1366, 2005.

SHAHRIYARI, L.; KOMOROVA, N. L. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? **PLoS One**, v. 8, n. 10, e76195, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076195>>. Acesso em 10/12/2013.

SHAY, J. W.; ZOU, Y.; HIYAMA, E.; WOODRING, E. W. Telomerase and cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 7, p. 677-685, 2001.

SHIH, Y.-R.; KUO, T. K.; YANG, A.-H.; LEE, O. K.; LEE, C.-H. Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. **Cell Proliferation**, v. 42, n. 4, p. 461-470, 2009.

SHIM, W. S.; JIANG, S.; WONG, P.; TAN, J.; CHUA, Y. L.; TAN, Y. S.; SIN, Y. K.; LIM, C. H.; CHUA, T.; TEH, M.; LIU, T. C.; SIM, E. *Ex vivo* differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 481-488, 2004.

SHIMIZU, N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 119-123, 2011.

SHIPANI, E.; KRONENBERG, H. M. **Adult mesenchymal stem cells**. In: StemBook [Internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27046/>>. Acesso em 20/12/2013.

SIEBZEHRUBL, F. A.; JESKE, I.; MÜLLER, D.; BUSLEI, R.; CORAS, R.; HAHNEN, E.; HUTTNER, H. B.; CORBEIL, D.; KAESBAUER, J.; APPL, T.; VON HÖRSTEN, S.; BLÜMCKE, I. Spontaneous *in vitro* transformation of adult neural precursors into stem-like cancer cells. **Brain Pathology**, v. 19, n. 3, p. 399-408, 2009.

SILVA, G. V.; LITOVSKY, S.; ASSAD, J. A.; SOUSA, A. L.; MARTIN, B. J.; VELA, D.; COULTER, S. C.; LIN, J.; OBER, J.; VAUGHN, W. K.; BRANCO, R. V.; OLIVEIRA, E. M.; HE, R.; GENG, Y. J.; WILLERSON, J. T.; PERIN, E. C. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, v. 111, n. 2, p. 150-156, 2005.

SILVA, W. A.; JUNIOR, D. T. C.; PANEPUCCI, R. A.; PROTO-SIQUEIRA, R.; SIUFI, J. L. C.; ZANETTE, D. L.; SANTOS, A. R. D.; ZAGO, M. A. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 21, n. 6, p. 661-669, 2003.

SIMONSEN, J. L.; ROSADA, C.; SERAKINCI, N.; JUSTESEN, J.; STENDERUP, K.; RATTAN, S. I.; JENSEN, T. G.; KASSEM, M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. **Nature Biotechnologies**, v. 20, n. 6, p. 592-596, 2002.

SMITH, R. A.; METTLIN, C. J.; EYRE, H. Cervical Cancer. In: KUFFE, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; BAST, R. C.; GANSLER, T. S.; HOLLAND, J. F.; FREI, E. **Holland-Frei Cancer Medicine**, 6ª. ed. [Internet]. Hamilton: BC Decker; 2003. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12387/#A7567>>. Acesso em 15/08/2013.

SOMOZA, R. A.; RUBIO, F. J. Cell therapy using induced pluripotent stem cells or somatic stem cells: this is the question. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 191-196, 2012.

SOOST, H. J.; LANGE, H. J.; LEHMACHER, W.; RUFFING-KULLMANN, B. The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. **Acta Cytologica**, v. 35, n. 1, p. 8-14, 1991.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1409-1410, 2006.

SPIROPOULOS, A.; THEODOSAKI, M.; STEFANAKI, K.; PATERAKIS, G.; TZETIS, M.; GIANNIKOU,

K.; PETRAKOU, E.; DIMOPOULOU, M. N.; PAPASSOTIRIOU, I.; ROMA, E. S.; KANAVAKIS, E.; GRAPHAKOS, S.; GOUSSETIS, E. Rapid clinical-scale propagation of mesenchymal stem cells using cultures initiated with immunoselected bone marrow CD105⁺ cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1983-1988, 2011.

STACHELSCHIED, H.; WULF-GOLDENBERG, A.; ECKERT, K.; JENSEN, J.; EDSBAGGE, J.; BJÖRQUIST, P.; RIVERO, M.; STREHL, R.; JOZEFCZUK, J.; PRIGIONE, A.; ADJAYE, J.; URBANIAK, T.; BUSSMANN, P.; ZEILINGER, K.; GERLACH, J. C. Teratoma formation of human embryonic stem cells in three-dimensional perfusion culture bioreactors. **Journal of Tissue Engineering and Regeneration Medicine**, v. 7, n. 9, p. 729-741, 2013.

STEPHENSON, E.; OGILVIE, C. M.; PATEL, H.; CORNWELL, G.; JACQUET, L.; KADEVA, N.; BRAUDE, P.; ILIC, D. Safety paradigm: genetic evaluation of therapeutic grade human embryonic stem cells. **Journal of the Royal Society: Interface**, v. 7, p. S677-S688, 2010.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human molecular genetics**. 3 ed. London: Garland Science, 2003.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KÖSTERING, M.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V.; KÖGLER, G.; WERNET, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, v. 106, n. 15, p. 1913-1918, 2002.

STREM, B. M.; HICOK, K. C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R. E.; FRASER, J. K.; HEDRICK, M. H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **The Keio Journal of Medicine**, v. 54, n. 3, p. 132-141, 2005.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 14, p. 2724-2752, 2012.

SUGA, H.; SHIGEURA, T.; MATSUMOTO, D.; INOUE, K.; KATO, H.; AOI, N.; MURASE, S.; SATO, K.; GONDA, K.; KOSHIMA, I.; YOSHIMURA, K. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. **Cytotherapy**, v. 9, n. 8, p. 738-745, 2007.

SUNG, J. H.; YANG, H. M.; PARK, J. B.; CHOI, G. S.; JOH, J. W.; KWON, C. H.; CHUN, J. M.; LEE, S. K.; KIM, S. J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 8, p. 2649-2654, 2008.

TAHA, M. F.; HEDAYATI, V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cell. **Tissue and Cell**, v. 42, n. 4, p. 211-216, 2010.

TANG, H.; LOW, B.; RUTHERFORD, S. A.; HAO, Q. Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF- β receptor and down-regulation of TGF- β signaling in endothelial cells. **Blood**, v. 105, n. 5, 1977-1985, 2005.

TARTE, K.; GAILLARD, J.; LATAILLADE, J. J.; FOUILLARD, L.; BECKER, M.; MOSSAFA, H.; TCHIRKOV, A.; ROUARD, H.; HENRY, C.; SPLINGARD, M.; DULONG, J.; MONNIER, D.; GOURMELON, P.; GORIN, N. C.; SENSEBÉ, L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1549-1553, 2010.

TAVARES, S. B.; ALVES DE SOUSA, N. L.; MANRIQUE, E. J.; PINHEIRO DE ALBUQUERQUE, Z. B.; ZEFERINO, L. C.; AMARAL, R. G. Comparison of the performance of rapid prescreening, 10% random review, and clinical risk criteria as methods of internal quality control in cervical cytopathology. **Cancer**, v. 114, n. 3, p. 165-170, 2008.

TAVIL, B.; CETIN, M.; TUNCER, M. CD34/CD117 positivity in assessment of prognosis in children with myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 30, n. 2, p. 222-224, 2006.

THIRABANJASAK, D.; TANTIWONGSE, K.; THORENER, P. S. Angiomyeloproliferative lesions following autologous stem cell therapy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 7, p. 1218-1222, 2010.

THOMAS, B.; EYRIES, M.; MONTAGNE, K.; MARTIN, S.; AGRAPART, M.; SIMERMAN-FRANÇOIS, R.; LETARTE, M.; SOUBRIER, F. Altered endothelial gene expression associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 7, p. 580-587, 2007.

TIAN, H.; MYTHREYE, K.; GOLZIO, C.; KATSANIS, N.; BLOBE, G. C. Endoglin mediates

fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$ integrin and TGF- β pathway crosstalk in endothelial cells. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 19, p. 3885-3900, 2012.

TIMPER, K.; SEBOEK, D.; EBERHARDT, M.; LINSCHIED, P.; CHRIST-CRAIN, M.; KELLER, U.; MÜLLER, B.; ZULEWSKI, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p. 1135-1140, 2006.

TÖGEL, F.; HU, Z.; WEISS, K.; ISAAC, J.; LANGE, C.; WESTENFELDER, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. 31-42, 2005.

TOLAR, J.; LE BLANC, K.; KEATING, A.; BLAZAR, B. R. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 8, p. 1446-1455, 2010.

TOLAR, J.; NAUTA, A. J.; OSBORN, M. J.; PANOSKALTSIS MORTARI, A.; MCELMURRY, R. T.; BELL, S.; XIA, L.; ZHOU, N.; RIDDLE, M.; SCHROEDER, T. M.; WESTENDORF, J. J.; MCIVOR, R. S.; HOGENDOORN, P. C.; SZUHAI, K.; OSETH, L.; HIRSCH, B.; YANT, S. R.; KAY, M. A.; PEISTER, A.; PROCKOP, D. J.; FIBBE, W. E.; BLAZAR, B. R. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 2, p. 371-379, 2007.

TONTI, G. A.; MANNELLO, F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 8, p. 1023-1032, 2008.

TORRES, E. M.; SOKOLSKY, T.; TUCKER, C. M.; CHAN, L. Y.; BOSELLI, M.; DUNHAM, M. J.; AMON, A. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. **Science**, v. 317, n. 5840, p. 916-920, 2007.

TORSVIK, A.; RØSLAND, G. V.; SVENDSEN, A.; MOLVEN, A.; IMMERVOLL, H.; MCCORMACK, E.; LØNNING, P. E.; PRIMON, M.; SOBALA, E.; TONN, J. C.; GOLDBRUNNER, R.; SCHICHOR, C.; MYSLIWETZ, J.; LAH, T. T.; MOTALN, H.; KNAPPSKOG, S.; BJERKVIG, R. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track—letter. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6393-6396, 2010.

UEYAMA, H.; HORIBE, T.; HINOTSU, S.; TANAKA, T.; INOUE, T.; URUSHIHARA, H.; KITAGAWA, A.; KAWAKAMI, K. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 1, p. 72-82, 2012.

UMAR, S.; DE VISSER, Y. P.; STEENDIJK, P.; SCHUTTE, C. I.; LAGHMANI, EL H.; WAGENAAR, G. T.; BAX, W. H.; MANTIKOU, E.; PIJNAPPELS, D. A.; AT SMA, D. E.; SCHALIJ, M. J.; VAN DER WALL, E. E.; VAN DER LAARSE, A. Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, p. H1606-1616, 2009.

UTAGAWA, M. L.; SHIRATA, N. K.; MATTOSINHO DE CASTRO FERRAZ, M. G.; DI LORETO, C.; DALL'AGNOL, M.; LONGATTO-FILHO, A. Performance of 3 methods for quality control for gynecologic cytology diagnoses. **Acta Cytologica**, v. 52, n. 4, p. 439-444, 2008.

UYSAL, A. C.; MIZUNO, H. Differentiation of adipose-derived stem cells for tendon repair. In: GIMBLE, J. F.; BUNNEL, B. A. (ed). **Adipose-Derived Stem Cells: Methods in Molecular Biology**, v. 702, Berlin: Springer Science and Business Media, 2011, p. 443-451.

VALINA, C.; PINKERNELL, K.; SONG, Y. H.; BAI, X.; SADAT, S.; CAMPEAU, R. J.; LE JEMTEL, T. H.; ALT, E. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 28, n. 21, p. 2667-2677, 2007.

VAN DER SPOEL, T. I.; JANSEN OF LORKEERS, S. J.; AGOSTONI, P.; VAN BELLE, E.; GYÖNGYÖSI, M.; SLUIJTER, J. P.; CRAMER, M. J.; DOEVENDANS, P. A.; CHAMULEAU, S. A. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. **Cardiovascular Research**, v. 91, n. 4, p. 649-658, 2011.

VANIKAR, A. V.; DAVE, S. D.; THAKKAR, U. G.; TRIVEDI, H. L. Cotransplantation of adipose tissue-derived insulin-secreting mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells: a novel therapy for

insulin-dependent diabetes mellitus. **Stem Cells International**, v. 2010, e582382, 2010 [Internet]. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3010655/>>. Acesso em 10/12/2013.

VENKATESHA, S.; TOPORSIAN, M.; LAM, C.; HANAI, J.; MAMMOTO, T.; KIM, Y. M.; BDOLAH, Y.; LIM, K. H.; YUAN, H. T.; LIBERMANN, T. A.; STILLMAN, I. E.; ROBERTS, D.; D'AMORE, P. A.; EPSTEIN, F. H.; SELLKE, F. W.; ROMERO, R.; SUKHATME, V. P.; LETARTE, M.; KARUMANCHI, S. A. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 642-649, 2006.

VILALTA, M.; DÉGANO, I. R.; BAGÓ, J.; AGUILAR, E.; GAMBHIR, S. S.; RUBIO, N.; BLANCO, J. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as vehicles for tumor bystander effect: a model based on bioluminescence imaging. **Gene Therapy**, v. 16, n. 4, p. 547-556, 2009.

VON BONIN, M.; STÖLZEL, F.; GOEDECKE, A.; RICHTER, K.; WUSCHEK, N.; HÖLIG, K.; PLATZBECKER, U.; ILLMER, T.; SCHAICH, M.; SCHETELIG, J.; KIANI, A.; ORDEMANN, R.; EHNINGER, G.; SCHMITZ, M.; BORNHÄUSER, M. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. **Bone Marrow Transplantation**, v. 43, n. 3, pp. 245-251, 2009.

WAGNER, W.; WAGNER, W.; BORK, S.; HORN, P.; KRUNIC, D.; WALENDA, T.; DIEHLMANN, A.; BENES, V.; BLAKE, J.; HUBER, F. X.; ECKSTEIN, V.; BOUKAMP, P.; HO, A. D. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. **PLoS One**, v. 4, n. 6, e5846, 2009 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2688074/>>. Acesso em 20/11/2013.

WAN, C. D.; CHENG, R.; WANG, H. B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary and Pancreatic Disease International**, v. 7, n. 1, p. 29-33, 2008.

WANG, J. A.; LI, C. L.; FAN, Y. Q.; HE, H.; SUN, Y. Allograft bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarct model of rabbit to renovate infarcted heart. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, v. 5, n. 10, p. 1279-1285, 2004 [Internet]. Disponível em <<http://www.zju.edu.cn/jzus/article.php?doi=10.1631/jzus.2004.1279>>. Acesso em 08/06/2013.

WANG, S.; QU, X.; ZHAO, R. C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 5, n. 12, 2012 [Internet]. Disponível em <<http://www.jhoonline.org/content/5/1/19>>. Acesso em 14/08/2013.

WANG, X.; HISHA, H.; TAKETANI, S.; ADACHI, Y.; LI, Q.; CUI, W.; WANG, J.; SONG, C.; MIZOKAMI, T.; OKAZAKI, S.; LI, Q.; FAN, T.; FAN, H.; LIAN, Z.; GERSHWIN, M. E.; IKEHARA, S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 482-493, 2006.

WANG, Y.; ZHANG, Z.; CHI, Y.; ZHANG, Q.; XU, F.; YANG, Z.; MENG, L.; YANG, S.; YAN, S.; MAO, A.; ZHANG, J.; YANG, Y.; WANG, S.; CUI, J.; LIANG, L.; JI, Y.; HAN, Z. B.; FANG, X.; HAN, Z. C. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. **Cell Death and Disease**, v. 4, e950, 2013.

WERNER, B.; DINGLI, D.; LEANERTS, T.; PACHECO, J. M.; TRAULSEN, A. Dynamics of mutant cells in hierarchical organized tissues. **PLoS One**, v. 7, n. 12, e1002290, 2011 [Internet]. Disponível em <www.ploscompbiol.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pcbi.1002290>. Acesso em 05/12/2013.

WERNER, B.; DINGLI, D.; TRAULSEN, A. A deterministic model for the occurrence and dynamics of multiple mutations in hierarchically organized tissues. **Journal of Royal Society Interface**, v. 10, n. 85, e20130349, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/10/85/20130349.long>>. Acesso em 07/12/2013.

WILLIAMS, B. R.; PRABHU, V. R.; HUNTER, K. E.; GLAZIER, C. M.; WHITTAKER, C. A.; HOUSMAN, D. E.; AMON, A. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 703-709, 2008.

WILLIS, B. H.; HYDE, C. J. Estimating a test's accuracy using tailored meta-analysis-How setting-specific data may aid study selection. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 67, n. 5, p. 538-546, 2014.

XU, S.; DE BECKER, A.; DE RAEVE, H.; VAN CAMP, B.; VANDERKERKEN, K.; VAN RIET, I. *In vitro*

expanded bone marrow-derived murine (C57Bl/KaLwRij) mesenchymal stem cells can acquire CD34 expression and induce sarcoma formation *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 424, n. 3, p. 391-397, 2012.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 1, p. 43-52, 2007.

YAMAMOTO, Y.; FUJITA, M.; TANAKA, Y.; KOJIMA, I.; KANATANI, Y.; ISHIHARA, M.; TACHIBANA, S. Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells. **Bioresearch Open Access**, v. 2, n. 3, p. 199-205, 2013.

YANADA, S.; OCHI, M.; KOLIMA, K.; SHARMAN, P.; YASUNAGA, Y.; HIAYAM, E. Possibility of selection of chondrogenic progenitor cells by telomere length in FGF-2-expanded mesenchymal stromal cells. **Cell Proliferation**, v. 39, n. 6, p. 575-584, 2006.

YAÑEZ, R.; LAMANA, M. L.; GARCÍA-CASTRO, J.; COLMENERO, I.; RAMÍREZ, M.; BUEREN, J. A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. **Stem Cells**, v. 24, n. 11, p. 2582-2591, 2006.

YANG, C. C.; ZHU, L. F.; XU, X. H.; NING, T. Y.; YE, J. H.; LIU, L. K. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. **BMC Cancer**, v. 13, n. 171, 2013 [Internet]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637131/>>. Acesso em 15/03/2014.

YANG, S.; LIN, G.; TAN, Y. Q.; ZHOU, D.; DENG, L. Y.; CHENG, D. H.; LUO, S. W.; LIU, T. C.; ZHOU, X. Y.; SUN, Z.; XIANG, Y.; CHEN, T. J.; WEN, J. F.; LU, G. X. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 47, n. 8, p. 665-679, 2008.

YOSHIMURA, K.; SHIGEURA, T.; MATSUMOTO, D.; SATO, T.; TAKAKI, Y.; AIBA-KOJIMA, E.; SATO, K.; INOUE, K.; NAGASE, T.; KOSHIMA, I.; GONDA, K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, n. 1, p. 64-76, 2006.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A. BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A.; BLACK, A. C. JR. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

^aZHANG, D. Z.; GAI, L. Y.; LIU, H. W.; JIN, Q. H.; HUANG, J. H.; ZHU, X. Y. Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. **Chinese Medical Journal**, v. 120, n. 4, p. 300-307, 2007.

^bZHANG, Z. X.; GUAN, L. X.; ZHANG, K.; WANG, S.; CAO, P. C.; WANG, Y. H.; WANG, Z.; DAI, L. J. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 31, n. 6, p. 645-648, 2007.

ZHOU, Y. F.; BOSCH-MARCE, M.; OKUYAMA, H.; KRISHNAMACHARY, B.; KIMURA, H.; ZHANG, L.; HUSO, D. L.; SEMENZA, G. L. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 22, p. 10849-10854, 2006.

ZHU, M.; KOHAN, E.; BRADLEY, J.; HEDRICK, M.; BENHAIM, P.; ZUK, P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 290-301, 2009.

ZIMMERMANN, S.; VOSS, M.; KAISER, S.; KAPP, U.; WALLER, C. F.; MARTENS, U. M. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. **Leukemia**, v. 17, n. 6, p. 1146-1149, 2003.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 2, p. 4279-4295, 2002.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-218, 2001.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 525

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

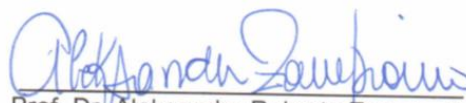
PROCESSO: 23075.071415/2011-51

APROVADO: 05/04/2011 – R.O. 03/2011

TÍTULO: Estabelecimento do *screening* genético de células tronco cultivadas derivadas da medula óssea e tecido adiposo (experimental em animais)

AUTORES: Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Reginaldo Justino Ferreira

DEPARTAMENTO: Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe e Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

ANEXO 2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 710

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

PROCESSO: 23075.021029/2013-80

APROVADO: 11/07/2013 – R.O. 06/2013

TÍTULO: Estabelecimento do *screening* genético de células tronco cultivadas da medula óssea e tecido adiposo (experimental em animais)

AUTORES: Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Reginaldo Justino Ferreira

DEPARTAMENTO: Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, UFPR


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

ANEXO 3

TABELA 1 – DETALHAMENTO DOS RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL E ISOLAMENTO CELULAR DE DEZ CÂMUNDONGOS MACHOS DA LINHAGEM SWISS.

PARÂMETROS	AMOSTRAS									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
IDADE DO ANIMAL	96	96	96	100	102	100	104	100	98	105
MASSA CORPORAL (G)	31,50	41,95	31,71	45,12	46,58	42,00	42,05	46,59	39,74	23,72
TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL (MG)	317	976	798	506	723	619	515	672	430	124
CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS	5,68 $\times 10^6$	2,18 $\times 10^6$	1,75 $\times 10^7$	2,22 $\times 10^5$	2,06 $\times 10^6$	6,00 $\times 10^6$	1,50 $\times 10^6$	9,45 $\times 10^6$	1,34 $\times 10^6$	7,34 $\times 10^6$
VIABILIDADE (%)	95,16	97,53	96,15	10,80	75,50	92,30	87,09	68,00	75,00	91,94
CÉLULAS ISOLADAS/MASSA CORPORAL (G)	1,80 $\times 10^5$	5,20 $\times 10^5$	5,52 $\times 10^5$	4,92 $\times 10^3$	4,41 $\times 10^4$	1,43 $\times 10^5$	3,57 $\times 10^4$	2,03 $\times 10^4$	3,36 $\times 10^4$	3,09 $\times 10^5$
CÉLULAS ISOLADAS/TECIDO ADIPOSEO (G)	1,79 $\times 10^7$	2,23 $\times 10^7$	2,19 $\times 10^7$	4,39 $\times 10^5$	2,84 $\times 10^6$	9,69 $\times 10^6$	2,91 $\times 10^6$	1,41 $\times 10^6$	3,10 $\times 10^6$	5,92 $\times 10^7$

FONTE: O autor (2013).

TABELA 2 – VIABILIDADE MÉDIA DOS INÓCULOS EM CADA PASSAGEM DOS CULTIVOS.

Passagem	Viabilidade média do inóculo (%)
P1	77,04 \pm 26,05
P2	94,47 \pm 4,88 ^A
P3	95,88 \pm 4,54 ^A
P4	89,22 \pm 5,50
P5	97,49 \pm 4,52 ^B
P6	90,38 \pm 10,29
P7	88,98 \pm 12,39
P8	89,42 \pm 9,91
P9	90,71 \pm 10,49
P10	95,49 \pm 3,26 ^A
P11	96,08 \pm 3,17 ^A
P12	95,23 \pm 5,33 ^A
P13	97,10 \pm 2,61 ^B
P14	97,05 \pm 2,02 ^B
P15	98,18 \pm 1,21 ^B

LEGENDA: DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO A P1, PARA VALORES DE $P < 0,05^A$ E $P < 0,01^B$ (ANOVA E TESTE DE TUKEY).

FONTE: O autor (2013).

TABELA 3 – DURAÇÃO MÉDIA DE CADA PASSAGEM DOS CULTIVOS.

Passagem	Duração média (dias)
P1	4,50±0,53
P2	5,80±1,23
P3	9,60±4,55
P4	11,80±5,61
P5	13,70±9,39
P6	9,30±2,71
P7	9,10±3,45
P8	8,50±3,54
P9	8,10±2,42
P10	7,11±2,09
P11	6,67±2,65
P12	5,67±1,58
P13	5,50±1,31
P14	5,88±2,23

FONTE: O autor (2013).

TABELA 4 – NÍVEIS DESCRITIVOS (“Q-VALUE”) OBTIDOS NA COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DOS VALORES MÉDIOS DO TEMPO DE DURAÇÃO DE CADA PASSAGEM (ANOVA E TESTE DE TUKEY, $\alpha=0,05$ E $\alpha=0,01$).

	PASSAGENS												
	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
P1	1,067	4,188	5,994 ^{A,B}	7,554 ^{A,B}	3,941	3,859	3,284	2,956	2,087	1,732	0,932	0,774	1,064
P2	–	3,120	4,927 ^B	6,487 ^{A,B}	2,874	2,792	2,217	1,889	1,048	0,692	0,106	0,232	0,058
P3		–	1,806	3,366	0,246	0,328	0,903	1,232	1,989	2,344	3,144	3,174	2,884
P4			–	1,156	2,053	2,135	2,710	3,038	3,747	4,103	4,902 ^B	4,877 ^B	4,587
P5				–	3,613	3,695	4,270	4,598	5,266 ^B	5,621 ^{A,B}	6,420 ^{A,B}	6,348 ^{A,B}	6,058 ^{A,B}
P6					–	0,082	0,656	0,985	1,749	2,105	2,904	2,942	2,651
P7						–	0,574	0,903	1,669	2,025	2,824	2,864	2,574
P8							–	0,328	1,110	1,465	2,264	2,322	2,032
P9								–	0,790	1,146	1,945	2,013	1,722
P10									–	0,346	1,125	1,218	0,934
P11										–	0,779	0,881	0,598
P12											–	0,126	0,157
P13												–	0,275
P14													–

LEGENDA: DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA PARA VALORES DE $P<0,01^A$ E $P<0,05^B$.

FONTE: O autor (2013).

ANEXO 4

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR PAPANICOLAOU EM CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

AMOSTRA 1								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
1167	3	3	525	6	2	339	0	9
AMOSTRA 2								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
740	0	3	394	8	10	NR		
AMOSTRA 3								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
405	4	5	594	21	16	NR		
AMOSTRA 4								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
1428	2	5	210	6	3	630	9	6
AMOSTRA 5								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
966	1	8	293	0	4	711	5	6
AMOSTRA 6								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
1098	0	15	566	0	5	592	0	19
AMOSTRA 7								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
1580	1	2	459	0	2	1207	9	8
AMOSTRA 8								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
510	1	3	746	3	5	585	5	2
AMOSTRA 9								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
390	1	1	413	3	3	410	3	7
AMOSTRA 10								
P3			P9			P15		
CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	CÉLULAS (TOTAL)	MORFOLOGIA	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO
1167	2	12	961	13	0	741	2	7

LEGENDA: NR – NÃO REALIZADO (AMOSTRAS CUJOS CULTIVOS FORAM INTERROMPIDOS ENTRE P9 E P15).

FONTE: O autor (2013).

ANEXO 5

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G EM CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

AMOSTRA A1					
P3		P9		P15	
CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS
17	40 (40,XY)	1	52	2	60
1	73	1	64	3	63
		1	66+1A	2	63+1A
3	80	1	68	2	64
		1	69+2A	3	65+1A
		2	70	1	65+2A
		1	71	2	66
		2	72	2	67+1A
		5	73	1	68
		2	73+1A	1	71+1A
		1	75	1	108
		1	75+3A	1	131
		1	84+1A		
		1	118+5A		
AMOSTRA A2					
10	40 (40,XY)	1	40 (40,XY)		
1	38	2	43		
1	39	1	46+1A		
1	41	1	49		
1	50	1	54+1A		
2	63	1	71+1A		
1	74	1	72+1A		
1	79	3	76		
3	80	2	78+1A		
		1	79		
		1	79+1A		
		4	80+1A		
		1	83+1A		
		1	85+1A		
AMOSTRA A3					
19	40 (40,XY)	5	40 (40,XY)		
2	80	1	40+1A		
		1	36		
		1	42		
		1	43		
		1	45		
		1	55		
		2	58		
		1	61		
		1	67		
		1	76		
		2	80		
		1	112		
		1	120		
		1	203+1A		
AMOSTRA A4					
18	40 (40,XY)	1	37	1	40 (40,XY)
1	34	1	42	1	41

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G EM CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

continuação

AMOSTRA A4					
P3		P9		P15	
CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS
1	37	1	43	1	40 (40,XY)
1	60			1	41
				1	42
				1	47+1A
				1	58+2A
				1	70
				1	72+1A
				1	72
				2	73+1A
				1	74+1A
				3	75+1A
				1	75+2A
				1	76+1A
				2	76
				1	77
				1	82
				1	102
AMOSTRA A5					
15	40 (40,XY)	2	43	1	42+1A
1	38	1	44	1	45
1	70	1	45	1	61
4	80	1	47	5	70
				1	70+1A
				1	72
				1	72+1A
				2	74
				1	74+1A
				1	75
				3	76
				1	77+1A
				1	78+6A
				1	79
AMOSTRA A6					
17	40 (40,XY)	11	40 (40,XY)	5	40 (40,XY)
1	33	1	37	1	42+2A
1	38	1	58	1	42
1	66	1	60	1	57
1	80	1	63	1	64+1A
		1	64	1	65+2A
		1	67	1	70
		2	75	1	73
		1	78	4	74
		1	80	3	75
				1	78
				1	80
AMOSTRA A7					
20	40 (40,XY)	4	40 (40,XY)	4	40 (40,XY)
1	79	1	33	1	38
		1	75	1	59
		1	76	1	67
		1	78	2	68

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G EM CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

continuação

AMOSTRA A7					
P3		P9		P15	
CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS
		12	80	1	68+3A
		1	145+4A	1	70
				2	72
				2	75
				1	77
				2	78
				1	80
				1	80+1A
				1	158
AMOSTRA A8					
18	40 (40,XY)	1	45	1	33
3	80	1	50	1	46
		1	57	1	66
		1	71	3	68
		1	72	2	70
		1	73	3	72
		5	76	1	72+1A
		1	77	2	74
		2	78	1	76
		1	79	2	76+1A
		3	80	1	78
		1	80+1A	1	79
		1	83	1	80
		1	140	1	82
AMOSTRA A9					
18	40 (40,XY)	1	50	1	69
1	76	1	52	1	71
2	78	2	60+1A	2	72
		1	65	1	73
		1	69	1	74
		2	72	2	75
		2	74	1	75+1A
		1	75	5	76
		1	76	1	76+1A
		2	77	2	77
		2	78	1	78
		1	79	2	79
		3	80	1	79+1A
		1	150+1A		
AMOSTRA A10					
18	40 (40,XY)	5	72	1	44
1	77	2	73	1	55
2	80	2	74	1	64
		4	76	1	64+1A
		3	77	1	66
		3	78	1	67
		2	79	1	67+1A
				2	69
				2	70
				1	72

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G EM CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

conclusão

AMOSTRA A10					
P3		P9		P15	
CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS	CÉLULAS (METÁFASE)	CROMOSSOMOS
				1	72+1A
				1	73
				2	76
				2	77
				1	77+3A
				2	78

LEGENDA: A – AMPLIFICAÇÃO EXTRA-CROMOSSÔMICA.

FONTE: O autor (2013).

ANEXO 6

Produção das sondas de FISH

O DNA extraído a partir do cultivo dos clones 243O4, 313M8, 433H2 e 77N6 exibiu elevado teor de pureza e rendimento (FIGURA 1).

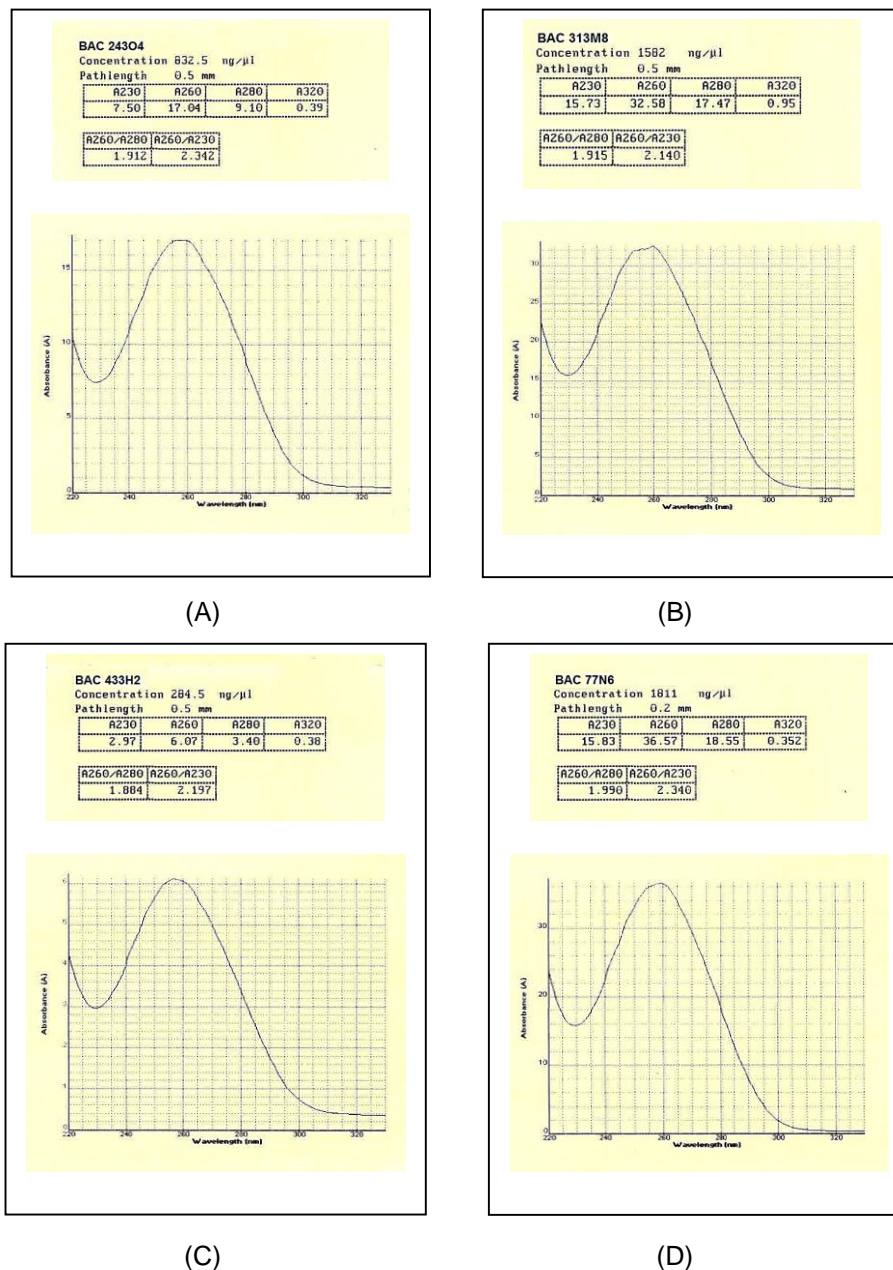


FIGURA 1 – PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO OBTIDO EM ESPECTROFOTÔMETRO DO TIPO *NANODROP* (*NANOVue PLUS®*, GE HEALTHCARE), DO DNA EXTRAÍDO DOS CULTIVOS DOS CLONES: A) 243O4; B) 313M8; C) 433H2; E D) 77N6.

FONTE: O autor (2013).

Quando tratados com DNase I a 2×10^{-4} U/ μ L por μ g de DNA, por 10 min a 37°C, o DNA obtido resultou em conjuntos de fragmentos adequados para uso como sondas de hibridação, com tamanhos predominantemente entre 100 e 500 pb (FIGURA 2). A marcação dos conjuntos de fragmentos resultou na produção de sondas de hibridação detectáveis em núcleos interfásicos das CTMTA cultivadas: um sinal do clone 243O4; e dois sinais dos clones 313M8, 433H2 e 77N6, quando do cariótipo normal (40,XY).

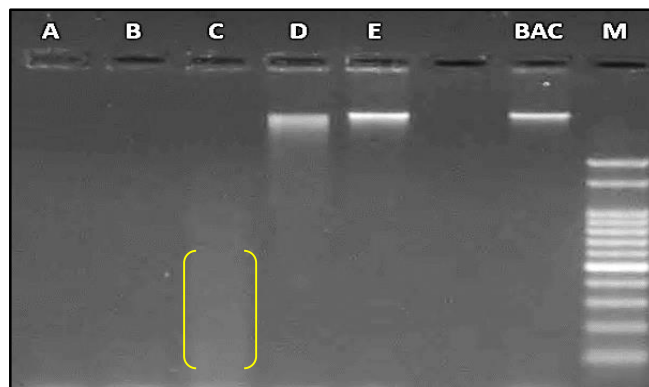


FIGURA 2 – ELETROFORESE DE DNA PLASMIDIAL DO CLONE 77N6 DIGERIDO COM DNASE I EM CONCENTRAÇÕES DE 2×10^{-2} U/ μ L A 2×10^{-6} U/ μ L (A A E) PARA CADA 1 μ G DE DNA, POR 10 MIN A 37°C. BAC: DNA DO CLONE 77N6, NÃO TRATADO COM DNASE I. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR DE 100 PB (LADDER). DESTAQUE: REGIÃO DO GEL APRESENTANDO A MAIOR PROPORÇÃO DE FRAGMENTOS NO TRATAMENTO C, COM TAMANHOS VARIANDO DE <100 PB A ~700 PB. GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TAE 1x, SUBMETIDO A 100 MV POR 1 H E CORADO COM ETBR A 0,5 μ G/ML.

FONTE: O autor (2013).

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR FISH PARA CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

AMOSTRA 1												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	90	1	9	0	20	20	46	14	12	43	30	15
10+16 (BAC3+7)	88	3	9	0	12	48	31	9	9	57	24	10
Médias	89,00%	2,00%	9,00%	0,00%	16,00%	34,00%	38,50%	11,50%	10,50%	50,00%	27,00%	12,50%
Anormal	11,00%				84,00%				89,50%			
AMOSTRA 2												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	64	21	15	0	15	60	16	9				
10+16 (BAC3+7)	52	24	24	0	9	72	13	6				
Médias	58,00%	22,50%	19,50%	0,00%	12,00%	66,00%	14,50%	7,50%				
Anormal	42,00%				88,00%							
AMOSTRA 3												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	97	0	3	0	37	31	20	14				
10+16 (BAC3+7)	91	1	8	0	21	44	17	18				
Médias	94,00%	0,50%	5,50%	0,00%	29,00%	37,50%	18,50%	16,00%				
Anormal	6,00%				72,00%							

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR FISH PARA CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

continuação

AMOSTRA 4												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	92	2	4	2	23	39	36	2	6	23	65	6
10+16 (BAC3+7)	97	0	2	1	26	24	30	10	2	19	78	1
Médias	94,50%	1,00%	3,00%	1,50%	24,50%	31,50%	33,00%	6,00%	4,00%	21,00%	71,50%	3,50%
Anormal	5,50%				70,50%				96,00%			

AMOSTRA 5												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	77	6	17	0	4	34	62	0	3	80	15	2
10+16 (BAC3+7)	70	5	24	1	1	42	57	0	1	89	10	0
Médias	73,50%	5,50%	20,50%	0,50%	2,50%	38,00%	59,50%	0,00%	2,00%	84,50%	12,50%	1,00%
Anormal	26,50%				97,50%				98,00%			

AMOSTRA 6												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	91	2	6	1	57	26	17	0	28	28	41	3
10+16 (BAC3+7)	77	6	17	0	53	30	12	1	22	44	30	4
Médias	84,00%	4,00%	11,50%	0,50%	55,00%	28,00%	14,50%	0,50%	25,00%	36,00%	35,50%	3,50%
Anormal	16,00%				43,00%				75,00%			

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR FISH PARA CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

continuação

AMOSTRA 7												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	98	2	0	0	14	15	66	5	24	19	54	3
10+16 (BAC3+7)	90	7	3	0	32	9	57	2	21	17	55	7
Médias	94,00%	4,50%	1,50%	0,00%	23,00%	12,00%	61,50%	3,50%	22,50%	18,00%	54,50%	5,00%
Anormal	6,00%				77,00%				77,50%			

AMOSTRA 8												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	89	3	8	0	6	60	27	7	4	44	50	2
10+16 (BAC3+7)	93	0	7	0	11	49	37	3	0	65	31	4
Médias	91,00%	1,50%	7,50%	0,00%	8,50%	54,50%	32,00%	5,00%	2,00%	54,50%	40,50%	3,00%
Anormal	9,00%				91,50%				98,00%			

AMOSTRA 9												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	91	1	7	1	5	61	23	11	12	51	29	8
10+16 (BAC3+7)	88	12	1	0	4	47	41	8	5	73	19	3
Médias	89,50%	6,50%	4,00%	0,50%	4,50%	54,00%	32,00%	9,50%	8,50%	62,00%	24,00%	5,50%
Anormal	11,00%				95,50%				91,50%			

continua

TABELA 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR FISH PARA CADA AMOSTRA E PASSAGEM.

conclusão

AMOSTRA 10												
Passagem	P3				P9				P15			
Cariótipo	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI	DISSOMIA	ANEU	TETRA	POLI
Combinação												
X+5 (BAC2+4)	93	6	1	0	6	72	20	2	5	78	15	2
10+16 (BAC3+7)	83	10	7	0	3	65	31	1	9	73	12	6
Médias	88,00%	8,00%	4,00%	0,00%	4,50%	68,50%	25,50%	1,50%	7,00%	75,50%	13,50%	4,00%
Anormal	12,00%				95,50%				93,00%			

Legenda: ANEU – aneuploidia (exceto tetrassomia e polissomia de ambos os pares de sondas); TETRA – tetrassomia para ambos os pares de sondas; POLI – polissomia para ambos os pares de sondas.

ANEXO 7



PATOLOGISTAS ASSOCIADOS LTDA.

CNPJ: 77500122 / 0001-71

Anatomia Patológica e Citopatologia

Exame nº 13/T00001

Nome : TUMOR C12 E C13
Origem :
Requis. : Dr. REGINALDO

Idade :
Comp. :
CRM :
Data : 19/11/2013

Conv. : PARTICULAR

Matric. :

Exame(s) Solicitado(s):

Abdomen:

Biópsia, Aspiração, Bloco, Peça Radical

21.01.002.1 x 1

Relatório de Exame:

Resumo Clínico:

Dados : 1. TUMOR C12 2. TUMOR C13

Macroscopia:

1. Três fragmentos irregulares de tecido amarelo esbranquiçado e mole, o maior com 1,5 cm em maior diâmetro. Amostragem: 1/3 (ti).
2. Três fragmentos irregulares de tecido amarelo esbranquiçado e mole, o maior com 0,9 cm em maior diâmetro. Amostragem: 1/3 (ti).

Diagnóstico:

1 e 2- Fragmentos de tecido semelhantes entre si e representados por tecido fibroadiposo infiltrado por processo neoplásico constituído por células redondas pequenas e grandes de padrão epitelioide, com atipias representadas por multinucleação, núcleos pleomórficos, membrana nuclear irregular, macronúcleos, cromatina grosseira e irregular. Há atividade mitótica acentuada com presença de mitoses atípicas. Extensas áreas de necrose.

Aspecto histológico condizente com processo neoplásico maligno indiferenciado com células redondas pequenas e células epitelíoides.

Curitiba, 19/11/2013

Dra. Lismary Ap. de Forville Mesquita
CRM: 12.443